

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARIÁDINE REDER CUSTÓDIO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS DE FOLHAS DE BARDANA (*Arctium lappa*) OBTIDOS PELOS
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (CO₂+ETANOL) E LÍQUIDO
PRESSURIZADO

CURITIBA

2019

ARIÁDINE REDER CUSTÓDIO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS DE FOLHAS DE BARDANA (*Arctium lappa*) OBTIDOS PELOS
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (CO₂+ETANOL) E LÍQUIDO
PRESSURIZADO

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Engenharia de
Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele C. Mesomo
Bombardelli

CURITIBA

2019

Catalogação na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S729a Souza, Ariádine Reder Custódio de
Avaliação da composição química e atividade biológica de extratos de folhas de bardana (*Arctium lappa*) obtidos pelos métodos de extração supercrítica (CO₂+etanol) e líquido pressurizado [recurso eletrônico] / Ariádine Reder Custódio de Souza – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

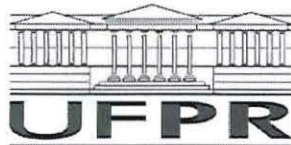
Orientador: Marcos Lúcio Corazza

Coorientadora: Michele C. Mesomo Bombardelli

1. Antioxidantes. 2. Compostos fenólicos. 3. Bardana (Planta). 4. Solventes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Corazza, Marcos Lúcio. III. Bombardelli, Michele C. Mesomo. IV. Título.

CDD: 664.804

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585




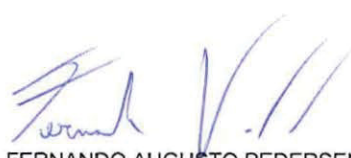
TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ARIÁDINE REDER CUSTÓDIO DE SOUZA** intitulada: **Avaliação da composição química e atividade biológica de extratos de folhas de Bardana (*Arctium lappa*) obtidos pelos métodos de extração supercrítica (CO₂+etanol) e líquido pressurizado**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Junho de 2019.


MARCOS LÚCIO CORAZZA
Presidente da Banca Examinadora


FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Avaliador Externo (UFPR)


AGNES DE PAULA SCHEER
Avaliador Interno (UFPR)


ROBERTA LETICIA KRUGER
Avaliador Externo (UNICENTRO)


FABIANE HAMERSKI
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais,
Danilo e Eliana, que incansavelmente
lutaram para que eu pudesse chegar até
aqui. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que se faz presente em cada trajetória de minha vida, dando-me discernimento para seguir os caminhos que me trouxeram até aqui.

Aos meus amados pais, Danilo e Eliana, alicerce de nossa família, por serem meu exemplo de caráter e determinação. Obrigada por todo esforço para que a educação sempre estivesse em primeiro lugar. Sem vocês eu jamais teria conseguido. A conclusão desta etapa é nossa.

Aos meus irmãos Anáile e Danilo Jr. por todo apoio e carinho incondicional. Ao meu cunhado-irmão Renan, pelo incentivo e amizade.

À Olivia, minha din, por despertar a alegria e um novo amor dentro do meu coração.

Ao meu marido Felipe, por toda compreensão, amor, companheirismo e apoio nesta etapa. Obrigada por estar ao meu lado e por sempre acreditar em mim.

Os mais sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof^o Marcos Lúcio Corazza, por lá no início ter me aceito em seu grupo, pela confiança em mim depositada, pela disponibilidade em ensinar, ajudar e estimular meu potencial. Obrigada pela compreensão e amizade durante esta caminhada.

À Prof^a Michele C. Mesomo Bombardelli, minha co-orientadora e amiga, por me incentivar a entrar no doutorado e por acreditar em mim. Obrigada pela disponibilização da infraestrutura do LaPros-UNICENTRO para realização de parte deste estudo.

Às minhas queridas amigas Rafaela, Amanda, Priscila e Laís, que foram fundamentais para a conclusão desta etapa. Obrigada pelas conversas, pelos estudos, pelos choros e pelos sorrisos. Estarão para sempre em meu coração.

À todos os colegas do LACTA que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho. Agradeço em especial a Fabiane Hamerski por toda ajuda na realização de análises e compreensão dos resultados. Obrigada Fabi pela pronta disponibilidade e pelos momentos de descontração.

Ao Lacta pela estrutura e equipamentos cedidos.

Ao PPPGEAL pela oportunidade deste doutorado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*Ninguém caminha sem aprender a
caminhar, sem aprender a fazer o
caminho caminhado, refazendo e
retocando o sonho pelo qual se pôs a
caminhar (Paulo Freire).*

RESUMO GERAL

A *Arctium lappa*, conhecida no Brasil como bardana, é uma planta medicinal com ampla aplicação na medicina popular. Diversos estudos já comprovaram seu potencial biológico. No entanto, pouco se relatou até o momento em relação as propriedades oriundas das folhas desta matriz vegetal. A constante busca por novas fontes naturais ricas em aplicações nutricionais e nutraceuticas despertam o interesse na investigação dos extratos de *A. lappa*. Com o objetivo de avaliar os extratos das partes aéreas desta planta, neste estudo foram avaliados diferentes métodos de extração que viabilizassem a obtenção de extratos biologicamente ativos. Os métodos avaliados foram a extração com fluido supercrítico e a extração com fluido pressurizado e, para ambos os casos, as variáveis temperatura (40, 60 e 80 °C) e pressão (15, 20, 25 MPa) foram analisadas. Para as extrações realizadas pelo método com fluido supercrítico, o solvente utilizado foi o CO₂ supercrítico com adição de etanol como co-solvente. Para esta técnica, a variável temperatura foi a única que mostrou interferência significativa em relação aos resultados de rendimento de extrato. Das diferentes condições de extração empregadas, a que apresentou maior rendimento de extrato (aproximadamente 6 %) foi a 15 MPa e 80 °C, no qual também se mensurou satisfatórios resultados frente as propriedades biológicas. Ainda em relação aos extratos obtidos por fluido supercrítico, realizou-se uma investigação a cerca da atividade imunomoduladora de alguns destes extratos. Por meio desta análise, foi avaliada a capacidade reguladora dos extratos em relação a ativação do sistema complemento, pelas vias clássica e alternativa. Todos os extratos avaliados apresentaram respostas positivas, demonstrando conter propriedade anti-inflamatória, inserindo assim a *A. lappa* como alternativa promissora no tratamento de doenças inflamatórias associadas ao sistema complemento. A técnica de extração com líquido pressurizado foi investigada e, assim como verificado para SFE, as melhores condições de extração foram obtidas a 15 MPa e 80 °C, obtendo-se 37 % de rendimento. No entanto para esta técnica identificou-se como solvente ideal uma solução hidroalcoólica, constituída por uma mistura de água em etanol (fração mássica de água fixa em 12 %). Todos os extratos obtidos e avaliados neste estudo apresentaram propriedades biológicas ativas, com boas respostas para atividade antioxidante (avaliada pelas técnicas DPPH, ABTS, FRAP e redução do complexo fosfomolibdênio) e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. A identificação de compostos fenólicos mostrou que os extratos PLE possuem elevadas concentrações de compostos como ácido clorogênico e rutina, concordando assim com as respostas antioxidantes obtidas. Análises de composição química (CG/MS) também possibilitaram a identificação de compostos com elevado potencial biológico como amirina, lupeol e fitol. Em geral, os extratos obtidos a 15 MPa e 80 °C apresentaram altas atividades biológicas, demonstrando que ambos processos de extração são tecnologias promissoras para a obtenção de extratos biologicamente ativos a partir das folhas de *A. lappa*.

Palavras-chave: Extração não convencional, matriz vegetal, solvente pressurizado, solvente supercrítico, co-solvente, sistema complemento, atividade antioxidante, compostos fenólicos.

GENERAL ABSTRACT

Arctium lappa, known in Brazil as burdock, is a medicinal plant with wide application in folk medicine. Several studies have already proven their biological potential. However, little has been reported so far in relation to the properties from the leaves of this plant matrix. The constant search for new natural sources rich in nutritional and nutraceutical applications arouse interest in the investigation of extracts of *A. lappa*. With the objective of evaluating the extracts of the aerial parts of this plant, in this study were evaluated different extraction methods that enabled the obtaining of biologically active extracts. The methods evaluated were the extraction with supercritical fluid and the extraction with pressurized fluid and, for both cases, the variables temperature (40, 60 and 80 °C) and pressure (15, 20, 25 MPa) were analyzed. For the extractions carried out by the supercritical fluid method, the solvent used was supercritical CO₂ with addition of ethanol as co-solvent. The temperature variable was the only one that showed significant interference with the extract yield results. Of the different extraction conditions employed, the one with the highest extract yield (approximately 6 wt%) was at 15 MPa and 80 °C, in which satisfactory results were also measured against the biological properties. Also in relation to the extracts obtained by supercritical fluid, an investigation was made about the immunomodulatory activity of some of these extracts. Through this analysis, the regulatory capacity of the extracts was evaluated in relation to the activation of the complement system, through the classical and alternative pathways. All extracts evaluated presented positive responses, demonstrating that they contain anti-inflammatory properties, thus inserting *A. lappa* as a promising alternative in the treatment of inflammatory diseases associated with the complement system. The pressurized liquid extraction technique was investigated and, as verified for SFE, the best extraction conditions were obtained at 15 MPa and 80 °C, yielding 37 wt% yield. However, for this technique, a hydroalcoholic solution consisting of a mixture of water in ethanol (fixed water mass fraction of 12%) was identified as the ideal solvent. All extracts obtained and evaluated in this study showed active biological properties, with good responses to antioxidant activity (evaluated by DPPH, ABTS, FRAP and reduction of phosphomolybdenum complex) and antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus*. The identification of phenolic compounds showed that PLE extracts have high concentrations of compounds such as chlorogenic acid and rutin, thus agreeing with the antioxidant responses obtained. Analyses of chemical composition (CG/MS) also allowed the identification of compounds with high biological potential as amirina, lupeol and phytol. In general, the extracts obtained at 15 MPa and 80 °C showed high biological activities, demonstrating that both extraction processes are promising technologies for obtaining biologically active extracts from *A. lappa* leaves.

Keywords: Unconventional extraction, plant matrix, pressurized solvent, supercritical solvent, co-solvent, complement system, antioxidant activity, phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PLANTA BARDANA (<i>Arctium lappa</i>): A) PLANTA ADULTA; B) FOLHA; C) FLOR; D) RAIZ	16
FIGURA 2 - CATEGORIAS DOS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES	24
FIGURA 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO	31
FIGURA 4 - ESQUEMA DO EXTRATOR SOXHLET CONVENCIONAL.....	33
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FASES DE UM FLUIDO (TC- TEMPERATURA CRÍTICA; PC- PRESSÃO CRÍTICA)	35
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	38
FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL EM CO ₂ (NA ETAPA DE EXTRAÇÃO ESTÁTICA) NAS EXTRAÇÕES DE <i>A. LAPPA</i> : CURVAS DE EXTRAÇÃO NA RAZÃO INICIAL ETANOL/ CO ₂ (SMR) DE (▲) SMR = 0; (◇) SMR = 0,33; (O) SMR = 0,85 E (□) SMR = 1,88, A T=60°C E P=20 MPa. OS SÍMBOLOS SÃO DADOS EXPERIMENTAIS E LINHAS CONTÍNUAS E TRACEJADAS SÃO VALORES CALCULADOS USANDO O MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM.	58
FIGURA 8 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>A. LAPPA</i> UTILIZANDO SCCO ₂ E ETANOL (SCCO ₂ + ETOH) EM UMA RAZÃO FIXA ENTRE ETANOL E CO ₂ (SMR) DE 0,88 A (O) 40°C E 15 MPa, (Δ) 40°C E 25 MPa, (●) 80°C E 15 MPa, E (▲) 80°C E 25 MPa. AS BARRAS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO EXPERIMENTAL DAS TRIPLICATAS. SÍMBOLOS SÃO DADOS EXPERIMENTAIS E LINHAS CONTÍNUAS E TRACEJADAS SÃO VALORES CALCULADOS USANDO O MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM.	59
FIGURA 9 - PARÂMETROS CINÉTICOS EM FUNÇÃO DA RELAÇÃO INICIAL ETANOL / CO ₂ (SMR): (A) RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM EQUILÍBRIO (Y _E) E (B) TAXA CONSTANTE DE EXTRAÇÃO (K).	61
FIGURA 10 - CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (TPC) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA-METODOLOGIA DPPH) NOS EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS COM scCO ₂ + EtOH. OS NÚMEROS DAS AMOSTRAS REFEREM-SE ÀS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA TABELA 5.	67
FIGURA 11 - SUPRESSÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO PELOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE <i>Arctium lappa</i> : (A), (B) e (C)	

REPRESENTAM A ATIVAÇÃO DA VIA CLÁSSICA (D), (E) e (F)	
REPRESENTAM A ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA.	79
FIGURA 12 - SISTEMA EXPERIMENTAL PLE: (1) RESERVATÓRIO; (2) BOMBA DE DESLOCAMENTO POSITIVO DE ALTA PRESSÃO; (3) VÁLVULA AGULHA DE BLOQUEIO DE FLUXO; (4) RECIPIENTE DE PRÉ-AQUECIMENTO; (5) CÉLULA DE EXTRAÇÃO COM CONTROLE DE TEMPERATURA; (6) RECIPIENTE DE REFRIGERAÇÃO; (7) BANHO ULTRATERMOSTATIZADO; (8) MANÔMETRO; (9) VÁLVULA AGULHA DE CONTROLE DE PRESSÃO; (10) VÁLVULA DE CONTRAPRESSÃO; (11) RECIPIENTE COLETOR DO EXTRATO FINAL; (12) SENSORES DE PRESSÃO E TEMPERATURA.....	87
FIGURA 13 - CURVAS DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM SEIS ETAPAS UTILIZANDO ETANOL COMO CO-SOLVENTE A 15 MPA E 80°C: (□) ETAPA 1; (■) ETAPA 2; (Δ) ETAPA 3; (●) ETAPA 4; (◇) ETAPA 5; (★) ETAPA 6.....	92
FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA E PRESSÃO NO RENDIMENTO PLE EM QUALQUER TEMPERATURA FIXA EM (A) 40°C E (B) 80°C, OU PRESSÃO FIXA EM (C) 15MPA E (D) 25 MPA.	95
FIGURA 15 - (A) GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO PARA AS VARIÁVEIS DE RESPOSTA TEMPERATURA E PRESSÃO ESTUDADAS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E (B) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CORRESPONDENTE.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES CRÍTICAS DE ALGUNS FLUIDOS UTILIZADOS COMO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	39
TABELA 2 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E SOLUBILIDADE PARA EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> UTILIZANDO scCO_2 + EtOH (GXLS).	55
TABELA 3 - CONDIÇÕES OPERACIONAIS E PARÂMETROS AJUSTADOS DA EQUAÇÃO (2.4) PARA AS EXTRAÇÕES DE <i>A. lappa</i> COM scCO_2 +ETANOL.....	57
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS POR CO_2 SUPERCRÍTICO COM ETANOL COMO CO-SOLVENTE.	63
TABELA 5 - ATIVIDADES ANTIOXIDANTES MENSURADAS PARA OS EXTRATOS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	65
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> FRENTE A ESPÉCIE BACTERIANA <i>Staphylococcus aureus</i>	69
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM scCO_2 +EtOH.....	75
TABELA 8 - RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELO MÉTODO DPPH PARA EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS A 15 MPa E 80°C USANDO scCO_2 +EtOH EM EXTRAÇÃO SEQUENCIAL (SE) E COM ADIÇÃO DE ÁGUA (scCO_2 +EtOH H_2O).	91
TABELA 9 - RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO, CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH) DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS POR PLE REALIZADAS A 15 MPa E 80°C, UTILIZANDO SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA COM DIFERENTES FRAÇÕES MÁSSICAS DE ÁGUA.	93
TABELA 10 - RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO, CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH) PARA EXTRATOS OBTIDOS POR PLE DE FOLHAS DE <i>A. lappa</i> SOB DIFERENTES	

TEMPERATURAS E PRESSÕES UTILIZANDO SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA (FRAÇÃO MÁSSICA DE ÁGUA FIXA EM 12%) COM SOLVENTE.....	94
TABELA 11 - COMPOSTO FENÓLICO IDENTIFICADO E RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA OS EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>A.</i> <i>lappa</i> OBTIDOS POR.....	98
TABELA 12 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>A. lappa</i> OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO EMPREGADOS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Atividade Antioxidante
ABTS	- Radical 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
CLX	- CO ₂ expandido a gás
CG/MS	- Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
DPPH	- Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EtOH	- Etanol
FRAP	- Poder antioxidante de redução férrica (Ferric Reduction Antioxidant Power)
GLX	- Líquido expandido a gás
HB	- Solução tampão Hepes
IC₅₀	- Concentração de amostra para inibição de 50% na concentração do substrato
NHS	- Soro humano normal
Pc	- Pressão crítica
PLE	- Extração com líquido pressurizado
scCO₂	- Dioxido de carbono supercrítico
scCO₂+EtOH	- Mistura CO ₂ supercrítico com etanol
scCO₂+EtOH_{H2O}	- Mistura CO ₂ supercrítico com solução hidroalcoólica
scCO₂-SE	- Extração sequencial com CO ₂ supercrítico
SE	- Extração sequencial
SFE	- Extração com fluido supercrítico
SMR	- Relação inicial de massa de etanos
Tc	- Temperatura crítica
TPC	- Conteúdo Fenólico Total

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 BARDANA	16
1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA BARDANA	17
1.3 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA BARDANA	20
1.3.1 Compostos fenólicos identificados na bardana	21
1.4 ANTIOXIDANTES.....	22
1.4.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	25
1.4.1.1 Compostos fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu	26
1.4.1.2 Método DPPH.....	27
1.4.1.3 Método ABTS	27
1.4.1.4 Método FRAP	28
1.5 ANTIMICROBIANOS.....	28
1.6 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA	29
1.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	31
1.7.1 Extração por solventes orgânicos.....	32
1.8 EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO	34
1.8.1 Curvas de extração e rendimento.....	37
1.8.2 Fluidos supercríticos.....	39
1.8.3 Co-solventes (modificadores)	40
1.9 EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO	42
CAPITULO 2 - EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE <i>Arctium lappa</i> USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO + ETANOL: CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÕES DE BIOATIVIDADE.....	44
2.1 INTRODUÇÃO.....	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.2.1 Materiais	47
2.2.2 Preparação da amostra	47
2.2.3 Determinação do teor de umidade e densidade da partícula.....	48

2.2.4	Extração Soxhlet.....	48
2.2.5	Extração por fluido supercrítico com adição de etanol	49
2.2.6	Solubilidade aparente	50
2.2.7	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS)	50
2.2.8	Atividade antioxidante.....	51
2.2.8.1	Determinação do conteúdo fenólico total.....	51
2.2.8.2	Ensaio espectrofotométrico DPPH	51
2.2.8.3	Método de redução do fosfomolibdênio	52
2.2.9	Avaliação da atividade antibacteriana	53
2.2.10	Análises estatísticas	53
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
2.3.1	Extrações.....	54
2.3.2	Composição química dos extratos das folhas de <i>A. lappa</i>	61
2.3.3	Atividade antioxidante.....	64
2.3.3.1	Conteúdo fenólico total (TPC)	64
2.3.3.2	Método de ensaio DPPH	66
2.3.3.3	Método de redução do complexo fosfomolibdênio	68
2.3.4	Atividade antibacteriana	69
2.4	CONCLUSÃO	70
CAPÍTULO 3 – EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE <i>Arctium lappa</i> COMO UM POTENCIAL REGULADOR DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO: AVALIAÇÃO DAS VIAS CLÁSSICA E ALTERNATIVA.....		72
3.1	INTRODUÇÃO.....	72
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	74
3.2.1	Extratos supercríticos	74
3.2.2	Análises do sistema complemento	76
3.2.2.1	Vias Clássica e Alternativa	76
3.2.2.2	Soro humano normal	76
3.2.2.3	Preparo de suspensões de eritrócitos de ovelhas e coelhos	76
3.2.2.4	Ensaio Hemolíticos das Vias Clássica e Alternativa	77
3.2.3	Análises estatísticas	78
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.4	CONCLUSÃO	81

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>Arctium lappa</i> OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO E CO₂ SUPERCRÍTICO	83
4.1 INTRODUÇÃO.....	83
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	85
4.2.1 Preparo e caracterização da matéria-prima.....	85
4.2.2 Métodos de extração	85
4.2.2.1 Extração sequencial com fluido supercrítico (SE)	85
4.2.2.2 Extração líquido pressurizado (PLE)	86
4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS).....	88
4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	88
4.2.4.1 Conteúdo fenólico total (TPC)	88
4.2.4.2 Ensaio DPPH.....	89
4.2.4.3 Ensaio FRAP	89
4.2.4.4 Ensaio ABTS	89
4.2.5 Identificação dos compostos fenólicos	89
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.3.1 Extração com fluido supercrítico.....	90
4.3.2 Extração com líquido pressurizado.....	93
4.3.3 Identificação dos compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante	96
4.3.4 Composição química	99
4.4 CONCLUSÃO	101
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104

INTRODUÇÃO

As plantas são fonte importante de produtos biologicamente ativos, sendo um caminho promissor para a descoberta de novas drogas. Além dos metabólitos primários, fundamentais para sobrevivência dos organismos vivos, as plantas apresentam em sua composição metabólitos secundários que possuem estrutura química e algumas vezes propriedades biológicas interessantes (SIMÕES et al., 1999).

Historicamente, os produtos naturais derivados de plantas têm sido uma fonte medicinal inesgotável. Entretanto, com o surgimento da química sintética no século XX, os fármacos sintéticos triunfaram em detrimento aos extratos naturais no tratamento de doenças. Após um longo período de êxito, a medicina convencional passou a apresentar limitações, como ineficácia terapêutica e dificuldade de desenvolvimento de produtos mais efetivos. Em virtude disso, atualmente existe uma forte tendência do mercado em retornar aos medicamentos oriundos de produtos naturais (LIU; WANG, 2008; RASKIN et al., 2002; SCHMIDT et al., 2008).

Além dos fins medicinais, a obtenção de produtos naturais é uma atividade de grande interesse para a indústria de alimentos. Diversos são os bioprodutos que podem ser obtidos de matérias-primas de origem vegetal, entre eles os extratos naturais que podem ser avaliados quanto ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano, com a finalidade de aplicação em alimentos e medicamentos (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Várias são as tecnologias utilizadas para extração desses produtos, porém a escolha da técnica deve levar em consideração fatores como rendimento, qualidade final do produto, o custo do processo, além de possíveis alterações na composição do extrato que podem diminuir sua bioatividade (MESOMO, 2013).

Os principais métodos convencionais de extração são a extração sólido-líquido com solventes orgânicos e a hidrodestilação, no entanto esses métodos apresentam alguns inconvenientes como, necessidade de elevadas temperaturas, uso excessivo de solventes orgânicos, longo tempo de processo, entre outros. Uma alternativa para anular esses inconvenientes é a utilização de tecnologias não convencionais de extração, como a extração por fluidos supercríticos (SFE) e a extração com líquido pressurizado (PLE). A SFE utiliza solventes em temperatura e pressão acima ou muito

próximas do seu ponto crítico. Em comparação com as técnicas de extração convencionais, a SFE evita a degradação de componentes termolábeis pois é realizada em temperaturas mais amenas e o solvente pode ser completamente removido do extrato final com facilidade (NASCIMENTO et al., 2016; SAHENA et al., 2009). O fluido supercrítico mais utilizado como solvente é o dióxido de carbono (CO₂) devido às suas propriedades críticas baixas (31,1 °C e 73,8 bar) e alta seletividade, o que o faz ser considerado um solvente ideal para extrair componentes bioativos, além de não ser tóxico e não explosivo (LANZA et al., 2005). O método de extração com líquido pressurizado (PLE - pressurized liquid extraction) consiste em submeter solventes orgânicos a condições controladas e elevadas de temperatura e pressão, com o intuito de extrair compostos de matrizes sólidas ou semi-sólidas em um curto tempo e com a utilização de pequena quantidade de solvente. Elevada temperatura e pressão aumentam o desempenho da extração, se comparada com técnicas que utilizam valores inferiores (CAMEL, 2001; MELLO et al., 2019).

Arctium lappa, conhecida popularmente como bardana, é uma planta medicinal com ampla aplicação na medicina popular. Ela é originária do continente Asiático e está aclimatada no Brasil (FONT QUER, 1988). A bardana é utilizada na medicina popular para tratamento de infecções, inflamações, febre, problemas crônicos de pele, gota, cálculo renal, úlcera gástrica, queimaduras e outras enfermidades (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Os extratos de diferentes frações desta planta - raízes, folhas, sementes e frutos – possuem aplicações terapêuticas (LIN et al., 2002). Muitas atividades biológicas já foram cientificamente comprovadas para espécies de *Arctium*, incluindo anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética, antimicrobiana, antifúngica e antioxidantes devido a quantidade de compostos fenólicos que possui (CHAN et al., 2011; LIU et al., 2014). No entanto, verifica-se na literatura uma menor prevalência de estudos das folhas em relação às raízes e sementes, apesar das folhas serem ricas em compostos fenólicos (LOU et al., 2010a). Assim como, não há relatos da técnica de SFE para obtenção de extratos de frações desta espécie.

Em suma, diante dos benefícios que extratos naturais podem oferecer a indústria alimentícia e farmacêutica, a busca por novas matérias-primas para obtenção de compostos biativos e com o intuito de identificar e contribuir para o entendimento dos fenômenos envolvidos no processo de extração, torna-se

interessante estudar diferentes técnicas para obtenção de extratos biologicamente ativos oriundos das folhas de *Arctium lappa*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial das extrações não convencionais com fluido supercrítico e líquido pressurizado na obtenção do extrato vegetal de folhas de bardana (*Arctium lappa*) e avaliar a qualidade biológica destes extratos.

Objetivos Específicos

- a) Obter extrato de folhas de bardana por diferentes métodos de extração: Soxhlet com etanol, CO₂ supercrítico, CO₂ supercrítico com adição de co-solvente etanol e extração com líquido pressurizado.
- b) Determinar o rendimento dos extratos de folhas de bardana obtidos pelos diferentes métodos avaliados neste trabalho.
- c) Determinar a influência das variáveis do processo sobre os rendimentos das extrações supercríticas: temperatura, pressão e presença de etanol como co-solvente.
- d) Realizar a caracterização química dos extratos obtidos por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS).
- e) Quantificar os compostos fenólicos totais. Bem como promover a identificação de alguns compostos fenólicos por cromatografia.
- f) Analisar a capacidade antioxidante dos extratos utilizando os métodos *in vitro*: DPPH, ABTS e FRAP.
- g) Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*.
- h) Determinar a atividade imunomoduladora dos extratos supercríticos.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

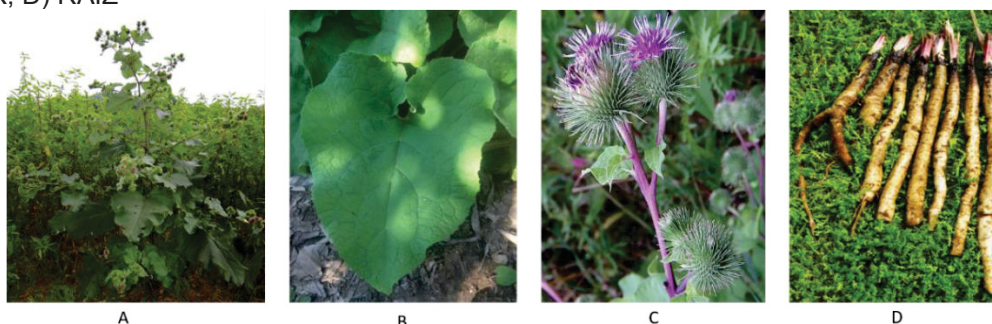
Neste capítulo serão apresentados tópicos sobre a bardana, os principais metabólitos produzidos (primários e secundários) e suas funcionalidades. Em seguida, serão abordadas as principais atividades biológicas da bardana: atividade antioxidante e antimicrobiana. Também será abordado as diferentes técnicas de extração para obtenção dos extratos desta planta.

1.1 BARDANA

Arctium lappa é uma planta medicinal taxonomicamente pertencente à família *Asteraceae*, que popularmente apresenta diversas sinonímias como: bardana, gobô, pergamasso, pegamoço, erva dos tinhosos, orelha-gigante, carrapicho-grande, entre outras. É uma espécie originária do continente Asiático, mas está aclimatada no Brasil, onde se desenvolve com facilidade em bosques, campos e áreas rurais pois é capaz de se desenvolver em ambientes úmidos e com pouca exposição a luz solar. Sua aclimação no território brasileiro foi suficiente para que seja considerada uma espécie invasora (CORRÊA, 1984; LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie é herbácea e bienal, ou seja, possui caule não lenhoso e demora cerca de 24 meses (oito estações) para completar seu ciclo biológico. Conforme apresentado na FIGURA 1, a planta é robusta, ereta e ramosa. Quando adulta pode alcançar dois metros de altura, apresentando folhas grandes em formato oval e lanceolado (forma de lança) que chegam a medir aproximadamente 40 cm de comprimento e 25 cm de largura, antes do florescimento.

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PLANTA BARDANA (*Arctium lappa*): A) PLANTA ADULTA; B) FOLHA; C) FLOR; D) RAIZ



FONTE: Adaptado de EL-DARIER; SALAMA (2016)

A floração dessa espécie acontece normalmente no verão, suas flores possuem coloração púrpura e ficam agrupadas em corimbos. O fruto é aquênio oblongo-subtrígono e possui papilos de pelos caducos (CORRÊA, 1984). Comumente as raízes, que podem chegar a 1,2 m de profundidade, são carnosas, fusiformes, brancas internamente e foscas externamente (FONT QUER, 1988).

A bardana é amplamente consumida nos países orientais, como Japão e China, devido a seu valor nutricional e qualidades medicinais (CHAN et al., 2011; LIU et al., 2014; TIAN et al., 2014). Na Europa, as folhas e os brotos novos são consumidos como verdura e no Japão é cultivada para a produção de raízes comestíveis (LORENZI; MATOS, 2002). Essa espécie contém diversos nutrientes, tais como inulina, mucilagens, fibra bruta, proteínas, cálcio, fósforo, ferro, vitaminas, minerais essenciais, lactonas sesquiterpênicas, vestígios de óleo essencial, poliacetilenos, fitoesteróis, taninos e lignanas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Além disso a bardana apresenta elevado conteúdo de compostos fenólicos em sua composição garantindo seu potencial antioxidante (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; FERRACANE et al., 2010; KU; LIU; LIN, 2013; LOU et al., 2010a).

As indicações populares da bardana são variadas. Ela pode ser usada para tratar doenças como dor de garganta e infecções, erupções cutâneas, furúnculos e vários tipos de enfermidades de pele (CHAN et al., 2011; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Na grande maioria seu consumo é feito na forma de infusão ou decocção, mas também pode ser utilizado externamente como cataplasma sobre regiões afetadas por queimaduras, úlceras e feridas com infecções (FONT QUER, 1988).

1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA BARDANA

Na medicina caseira todas as partes da espécie são utilizadas, porém sempre frescas, sendo consideradas depurativas, diuréticas, diaforéticas, anti-sépticas e estomáquicas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Os efeitos benéficos atribuídos a bardana, percebidos pelo uso popular, foi sendo ao longo dos anos embasado por meio de estudos científicos onde descreveram-se as atividades biológicas que essa planta apresenta. Dentre os principais efeitos biológicos destacam-se: atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antiúlcera, antiviral, anticancerígena e

antidiabética. Desta forma a bardana é tida como promissora no tratamento de doenças crônicas, como câncer, diabetes e AIDS (CHAN et al., 2011).

A atividade antioxidante se faz evidente para essa espécie. Um estudo recente indicou que polissacarídeos isolados de raízes da bardana apresentam potencial antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* podendo então exercer efeito favorável sobre a manutenção ou a melhoria dos sistemas antioxidantes do organismo humano (LIU et al., 2014).

Ao estudar as raízes da bardana, Chen et al. (2004) identificaram potencial redutor de radicais livres e atribuíram esse efeito antioxidante ao ácido clorogênico, que está presente em maior quantidade na casca das raízes da planta. Dessa forma, os ensaios realizados com a raiz estonada apresentaram potencial antioxidante reduzido em relação aos ensaios realizados com as raízes envoltas. A propriedade antioxidante identificada em extratos da raiz de bardana também foi atribuída ao ácido cafeoilquínico e a seus derivados por Jiang et al. (2016).

Estudo recente realizado por Rodriguez et al. (2018), também identificou atividade antioxidante para extratos obtidos por extração supercrítica da raiz da bardana.

O potencial antimicrobiano da espécie também vem sendo investigado. Pereira et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos obtidos de folhas de bardana, identificando sua eficácia contra as bactérias relacionadas a patógenos endodônticos (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Pseudomonas aeruginosa*).

A atividade antibacteriana da bardana também foi observada por Gentil et al. (2006), que utilizaram uma fração acetato de etila obtidos de extratos da planta em infecções dentárias caninas e, como resultados obtiveram que todas as cepas microbianas avaliadas no estudo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*) tiveram seu crescimento inibido na presença do extrato. Portanto, as folhas de bardana podem ser úteis no tratamento de doenças relacionadas com micro-organismos da cavidade oral.

Em estudo realizado por Lou et al. (2010b), a atividade antibacteriana de extratos das folhas de bardana foram comprovadas ao avaliarem sua ação contra seis bactérias relacionadas com os alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella typhimurium*) e verificarem que todas as cepas tiveram crescimento inibido pela

presença do extrato. Extrato glicosídico de bardana também apresentou potencial antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (OLIVEIRA et al., 2014). A fim de avaliar as propriedades anti-inflamatórias da bardana, Almeida et al. (2013) induziram o desenvolvimento de colite aguda em organismos vivos (ratos). A lactona sesquiterpenica “onipordopicrin” (ONP) foi isolada de extratos obtidos das folhas de bardana e administrada oralmente antes e após a indução da colite. Ao longo do estudo verificou-se que a ONP reduziu significativamente os pontos de inflamação no cólon e diminuíram as alterações morfológicas dos organismos afetados. Tais efeitos protetores confirmam a capacidade anti-inflamatória desta planta, justificando seu uso popular para tratar doenças gastrointestinais.

Em estudos semelhantes Huang et al. (2010) and Wu et al. (2014) resultados satisfatórios quanto a capacidade anti-inflamatória da bardana no tratamento de colite aguda.

Knipping et al. (2008) obtiveram extratos etanólicos das raízes e folhas da bardana e estes exibiram efeitos anti-inflamatórios pela inibição da degranulação e liberação de mediadores inflamatórios (leucotrienos cisteínicos) por células mononucleares do sangue.

Park et al. (2007), em estudo com lignanas isoladas de extrato das sementes de bardana obtido por extração metanólica, demonstraram o efeito anti-inflamatório percebido pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados por lipopolissacarídeos, uma vez que o aumento na produção de NO leva a formação de prostaglandinas que estão associadas ao surgimento de inflamações.

Lin et al. (1996) demonstraram características anti-inflamatórias do extrato bruto das raízes de bardana sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina. Além disso o extrato metanólico das raízes de bardana apresentou efeito anti-inflamatório capaz de inibir níveis de expressão do mRNA da proteína ciclo-oxigenase (WANG et al., 2006).

Estudos realizados com diferentes frações da espécie apontam muitas outras propriedades medicinais como: propriedade antialérgica com potencial para tratamento de dermatites crônicas (SOHN et al., 2011), eficácia no tratamento de acne (MIGLANI; MANCHANDA, 2014), propriedades anticâncer (MACHADO et al., 2012; SU; CHENG; WINK, 2015) e antienvelhecimento (SU; WINK, 2015), efeito neuroprotetor (TIAN et al., 2014), atividade hepatoprotetora (EL-KOTT; BIN-MEFERIJ,

2015; LIN et al., 2002) e ação antiúlcera (CARLOTTO et al., 2015; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2013a). Estudos têm sugerido que essa espécie possui efeito hipoglicemiante, principalmente devido seu elevado teor de inulina (até 45%), que é um polissacarídeo de reserva contido na raiz de sabor adocicado, mas que não é absorvido pelo organismo. Dessa forma a bardana é utilizada para retardar a digestão de hidratos de carbono, para reduzir a absorção de glicose e controlar as condições de hiperglicemia, apresentando potencial efeito antidiabetes (CHAN et al., 2011; XU et al., 2008). A bardana ainda apresenta propriedades anti-tuberculose (ZHAO et al., 2014).

1.3 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA BARDANA

A rede metabólica das plantas é a mais extensa dentre os organismos e, de modo geral, elas possuem em sua composição uma vasta gama de metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão presentes em todas as plantas e são aqueles essenciais para a sobrevivência como os lipídeos, os carboidratos, as proteínas e os nucleotídeos (AHARONI; GALILI, 2011). Por sua vez, os metabólitos secundários geralmente não estão envolvidos com as funções vitais das plantas, não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas variadas. Ao contrário das substâncias do metabolismo primário, os metabólitos secundários são compostos cuja biossíntese é restrita a grupos de plantas selecionadas, famílias ou gêneros (PICHESKY; GANG, 2000), sendo as principais classes produzidas pelas plantas divididas em três grandes grupos principais: compostos fenólicos, terpenóides e compostos que contêm nitrogênio ou enxofre (AHARONI; GALILI, 2011).

Além das diversas atividades biológicas identificadas para os extratos e frações da bardana, uma ampla gama de compostos presentes nesta planta responsáveis por essa bioatividade, já foram identificados. Os metabólitos primários recentemente encontrados incluem alguns carboidratos, como a inulina, galactose, ramanose, glicose, manose e frutanos (CARLOTTO et al., 2016; ISHIGURO et al., 2010; KARDOŠOVÁ et al., 2003; LIU et al., 2014). Entre os principais metabólitos secundários ativos isolados da bardana estão: Poliacetilenos (arctinona, arctinol e arctinal); Ácidos fenólicos (ácidos cafeico, clorogênico, cinarina); Lignan (arctina,

arctigenina e lapaóis); Flavonóides (quercetina, quercitrina, rutina e luteolina); Fitosteróis (β -sitosterol e estigmasterol), resinas e taninos (BURLANDO et al., 2010; CHAN et al., 2011; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; FERRACANE et al., 2010).

Além destes, alguns terpenóides também já foram identificados. Jeelani e Khuroo (2012) relataram a presença dos triterpenóides 3- α -hidroxilano-5,15-dieno e 3- α -acetoxi-hop-22(29)-eno em extrato das folhas da planta. A presença de lactonas sesquiterpênicas e β -eudesmol também são relatadas (ALMEIDA et al., 2013; YAYLI et al., 2005). Os terpenóides arctiol, β -eudesmol e fuquinona foram identificados e descritos por Burlando et al. (2010).

1.3.1 Compostos fenólicos identificados na bardana

Compostos fenólicos são quimicamente definidos como estruturas químicas que possuem elevado poder antioxidante devido as hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que apresentam. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Em alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonoides e as lignanas (ANGELO; JORGE, 2007).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (BRAVO, 1998). Aos ácidos fenólicos se atribuem os efeitos diuréticos e coleréticos (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Na bardana, são encontrados principalmente os ácidos clorogênicos e derivados do ácido caféico, como ácido cafeoilquínico e dicafeoilquínico (CARLOTTO et al., 2015; HAGHI; HATAMI; MEHRAN, 2013; JIANG et al., 2016). Jaiswal and Kuhnert (2011) identificaram na raiz da planta, diferentes ácidos clorogênicos (di- e tricafeoilquínicos) substituídos com ácidos fumárico, succínico e málico. Ferracane et al. (2010) demonstraram a existência de cinarina, ácido clorogênico e ácido caféico nas raízes, sementes e folhas da bardana. Além destes ácidos, Lou et al. (2010a) identificaram nas folhas da planta a presença de ácido *p*-cumárico e ácido *o*-hidroxibenzóico.

Flavonóides são compostos formados por 15 átomos de carbono, arranjados em uma configuração C₆-C₃-C₆. Essa estrutura é basicamente constituída por dois anéis

aromáticos, unidos por uma ponte de três carbonos usualmente na forma de um anel heterocíclico. Flavonóides podem ser classificados em antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Os flavonóides possuem ação antioxidante devido ao seu elevado potencial redox, o que lhes permite agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete. Flavonóides como luteína e quercetina ramnosideo foram identificados nas raízes e folhas de *A. lappa* (FERRACANE et al., 2010). Em raízes também foram isolados uma série de outros ácidos hidroxicinamoilquínicos (SILVA et al., 2013a).

As lignanas, ou linhanas, são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmílicos entre si ou destes com ácido cinâmico. Elas estão presentes na natureza preferencialmente na forma livre em relação à forma de derivados glicosilados (MACRAE; TOWERS, 1984). Na espécie *A. lappa*, as lignanas, principalmente a arctina e arctigenina, podem ser identificados nos frutos, sementes, raízes e folhas (FERRACANE et al., 2010; LIU et al., 2010; SOLYOMVÁRU et al., 2015; SU; WINK, 2015; WU et al., 2014). O isolapaol C e diarctigenina estão em maiores quantidades nas sementes (PARK et al., 2007).

Embora metabólitos bioativos sejam encontrados em diferentes frações da espécie, as folhas da bardana ainda são pouco estudadas em relação as demais partes. Além disso, durante a colheita para obtenção das raízes, as partes aéreas da *A. lappa* são descartadas. Desta forma investigar os efeitos biológicos dos extratos da folha contribui para um aproveitamento destes resíduos, tornando o cultivo da espécie ainda mais pertinente.

1.4 ANTIOXIDANTES

A oxidação é a principal causa de deterioração de vários produtos biologicamente importantes, alterando propriedades como a qualidade sensorial, valor nutricional, funcionalidade e toxidez (ARAÚJO, 2004). Além disso, reações de oxidação nas células humanas aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, envelhecimento precoce e outras (HALLIWELL, 1995; MOREIRA; VILLAS BOAS; FERREIRA, 2014).

As reações de oxidação acontecem quando elétrons são removidos de um átomo ou de um grupo de átomos, podendo ou não envolver a adição de átomos de oxigênio

ou remoção de átomos de hidrogênio da substância que está sendo oxidada. Os radicais livres são moléculas instáveis e altamente reativas por possuírem um elétron desemparelhado. A oxidação se inicia quando os radicais livres, buscando substituir o elétron que está ausente, atacam suas células vizinhas. Quando atacadas essas células cedem elétrons para os radicais livres, mas acabam se tornando novos radicais livres, desencadeando assim uma reação oxidativa em cadeia, o estresse oxidativo. Os antioxidantes têm a capacidade de interromper essa reação em cadeia doando seus próprios elétrons para os radicais livres, e essa interrupção só é possível por que os antioxidantes não se tornam novos radicais livres, mantendo sua estabilidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Todo organismo vivo que se expõe a ambientes oxigenados, está susceptível ao estresse oxidativo, quando há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo a geração excessiva de radicais livres, prejudicando a capacidade do sistema antioxidante em combatê-los. Assim, os sistemas biológicos desenvolveram defesas antioxidantes a fim de se proteger da oxidação (BARBOSA et al., 2010; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; PISOSCHI; POP, 2015).

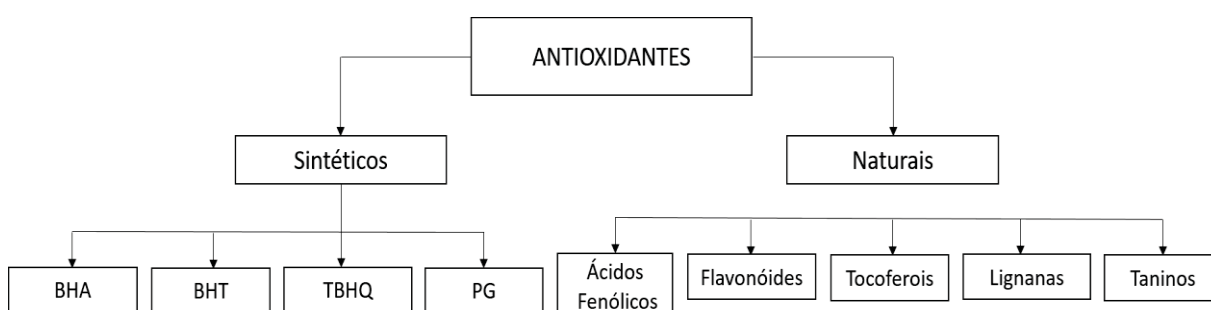
Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. Como existem diversos mecanismos químicos para inibição da oxidação, não existe uma definição única para “antioxidante”. Segundo descreve a ANVISA no Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, antioxidante é toda substância que retarda o aparecimento da alteração oxidativa em alimentos (BRASIL, 1961). Porém, de maneira geral, os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em concentrações inferiores às do substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar o mecanismo de oxidação deste substrato, por meio de uma reação com os radicais livres ou pelo sequestro do oxigênio singlete (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; HALLIWELL, 1995).

Com base em suas funções, os antioxidantes são classificados como: primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons. Nesta classe estão os compostos fenólicos polidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural como BHA, BHAT, TBHQ, que são sintéticos, e os tocoferóis, que são naturais. Os antioxidantes sinérgicos são classificados genericamente como removedores de oxigênio e complexantes. Os removedores de

oxigênio reagem com o oxigênio livre removendo-o de um sistema fechado, isto é, em situação na qual a quantidade de oxigênio é limitada. O ácido ascórbico e seus derivados, ácido eritórbico e palmitato de ascorbila, são exemplos deste grupo. Os agentes complexantes imobilizam íons metálicos, aumentando a energia de ativação das reações iniciais da oxidação. São exemplos deste grupo o ácido cítrico, fosfatos e EDTA (ARAÚJO, 2004).

Duas categorias básicas separam os antioxidantes em: sintéticos e naturais como apresentado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - CATEGORIAS DOS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES



FONTE: Adaptado de SHAHIDI; AMBIGAIPALAN (2015)

Como relatado anteriormente, diversos estudos têm avaliado a atividade biológica dos compostos fenólicos e comprovado seu poder antioxidante. As principais fontes destes antioxidantes naturais são as plantas, por possuírem compostos fenólicos em todas sua constituição. Eles podem ser encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, folhas, raízes e cascas (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes primários, devido ao seu papel como agentes redutores, doadores de hidrogênio, e supressores de oxigênio singlete (BRAVO, 1998; EMBUSCADO, 2015).

Extratos vegetais e óleos essenciais têm sido reportados como fontes de compostos fenólicos com poder antioxidante comprovado (CAI et al., 2004; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; SURVESWARAN et al., 2007; WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS, 2007).

Bhale et al. (2007) identificaram que extratos de alecrim e orégano apresentam capacidade de inibição da oxidação pela estabilização de radicais livres. O extrato de alecrim é capaz de estabilizar a oxidação lipídica em óleo de palma em processos de

fritura (GUO et al., 2016). Extratos de alcaçuz foram avaliados por Jiang et al. (2013) e sua atividade antioxidante foi superior a extratos de alecrim.

Extratos de cúrcuma (PEZESHK; REZAEI; HOSSEINI, 2011), assim como extratos de manjerição, louro, salsa, zimbro, anis, erva-doce, cominho e gengibre, também tiveram sua eficácia como substâncias antioxidantes confirmada (HINNEBURG; DAMIEN DORMAN; HILTUNEN, 2006).

O conteúdo de compostos fenólicos e, conseqüentemente, a capacidade antioxidante são alterados nos processos de extração pelo tipo de solvente utilizado para obtenção de extratos de fontes vegetais secas (SULAIMAN et al., 2011). Na literatura encontram-se estudos de extratos obtidos por diferentes métodos de extração, de diferentes frações da bardana, que avaliaram o potencial antioxidante da espécie (CAI et al., 2004; DUH, 1998; LOU et al., 2010b).

Entretanto, até onde se tem conhecimento a atividade antioxidante de extratos obtidos das folhas da bardana por extração supercrítica e por líquido pressurizado, ainda não foi avaliada. Sendo assim, a avaliação da atividade antioxidante destes extratos torna-se de grande valia. Como nestes métodos a extração é realizada a baixas temperaturas, bem como em ausência de luz e oxigênio, previne-se a degradação térmica e a decomposição de compostos termosensíveis, levando a uma maior estabilidade oxidativa dos compostos com possível potencial antioxidante.

1.4.1 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

As avaliações das propriedades antioxidantes dos compostos naturais são muito importantes devido ao seu uso na medicina, nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A atividade antioxidante não pode ser medida diretamente, mas sim pela capacidade do antioxidante em controlar a extensão da oxidação. Essa capacidade varia de acordo com a estrutura e concentração dos compostos bioativos presentes no alimento. Em decorrência disso, diferentes métodos podem ser utilizados para quantificar a capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais de um produto (ANTOLOVICH et al., 2002).

Entre os métodos estão a espectroscopia de absorção na região visível, método de fluorescência e quimiluminescência, métodos eletroquímicos e a determinação do potencial redox de antioxidantes. A capacidade antioxidante pode ser expressa por

meio de vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical peroxil (ORAC - oxygen radical absorbance capacity, TRAP - total reactive antioxidant potential), a capacidade de redução de metal (FRAP - ferric reducing antioxidant power, CUPRAC - cupric ion reducing antioxidant capacity), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhydrazil) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Já o conteúdo de polifenóis totais são comumente quantificados utilizando o método de Folin-Ciocalteu (ANTOLOVICH et al., 2002; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

Nestes ensaios a capacidade antioxidante pode ser medida em diferentes fases da oxidação, porém nenhum ensaio isolado irá refletir exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra. Portanto atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas que forneçam informações sobre a interferência antioxidante em diferentes fases de dano oxidativo (HU; SKIBSTED, 2002; PRIOR; CAO, 1999).

1.4.1.1 Compostos fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu

A metodologia para determinação dos compostos fenólicos totais foi desenvolvida inicialmente para determinação da proteína tirosina (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927). Anos depois essa metodologia foi adaptada para a avaliação dos compostos fenólicos em vinhos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999; SINGLETON; ROSSI, 1965).

O método se fundamenta no caráter redutor dos compostos fenólicos. O reagente Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungústico, onde molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺. Porém, quando esse reagente é posto em contato com os compostos fenólicos, que atuam como agentes redutores, formando um radical superóxido (O_2^-), que reage com o molibdato formando óxido de molibdênio (MoO_4^+), de coloração azul. Essa coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, ou seja, a coloração é proporcional ao conteúdo de fenólicos totais. A absorbância deve ser lida a 760 nm (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

1.4.1.2 Método DPPH

A atividade antioxidante é rotineiramente medida pelo método DPPH. Esse método é considerado um método colorimétrico padrão onde a avaliação das propriedades antioxidantes de compostos puros é feita facilmente. O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um radical livre, estável em solução, apresentando coloração purpura em metanol. Sua absorção é feita no comprimento de onda 515-518 nm. O ensaio se baseia na captura do radical por antioxidantes, partindo do princípio de que o DPPH é capaz de aceitar um átomo de hidrogênio, ou elétron, fornecido pelo átomo da molécula sequestrante, o antioxidante. Essa reação resulta na redução do DPPH à DPPH-H. A coloração purpura muda para amarelo com simultânea diminuição da absorbância a 518 nm. A mudança de cor é acompanhada por espectrofotometria e os dados da absorbância são utilizados para a determinação das propriedades antioxidantes (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

Este método foi inicialmente desenvolvido por Blois (1958), mas passou por algumas alterações a fim de adaptar o método para medir diferentes parâmetros cinéticos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

1.4.1.3 Método ABTS

A avaliação da atividade antioxidante também pode ser procedida pelo ensaio ABTS \bullet +. Esta metodologia está baseada na reação química correspondente a interação do 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico - ABTS) com persulfato de potássio, a qual tem como produto final o radical ABTS \bullet +. Este radical é caracterizado por apresentar uma coloração azul esverdeada com máxima absorbância em 645, 734 e 815 nm. Quando este radical é exposto a uma substância com potencial antioxidante, desencadeia-se uma reação de redução do radical monocatión (ABTS \bullet +) a sua forma inicial (ABTS), o que leva a perda da coloração do meio reacional (RE et al., 1999). O presente método apresenta elevada estabilidade e permite análises de compostos de natureza lipofílica e hidrofílica. Como parâmetro de resposta para essa metodologia, utiliza-se de um comparativo entre a absorção da reação entre o ABTS \bullet + e uma solução antioxidante com a absorção do padrão Trolox.

Desta forma, os resultados são expressos em termos de capacidade antioxidante em equivalente de Trolox (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

1.4.1.4 Método FRAP

Outro método comumente aplicado para determinação da atividade antioxidante é o método FRAP. Por meio desta metodologia identifica-se se a substância em avaliação possui a capacidade de reduzir o íon Fe^{3+} do complexo de 2,4,6-tripiridiltriazina- Fe^{3+} a Fe^{2+} sob condições ácidas, onde mantém-se pH 3,6. Se a redução acontecer desenvolver-se-á uma intensa coloração azul, indicando o potencial antioxidante. A absorbância é monitorada no comprimento de onda em 595 nm. Os valores obtidos podem ser expressos em micromolar de Fe^{2+} , ou em relação a um padrão antioxidante, como o Trolox (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

1.5 ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas que agem sobre micro-organismos inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição (SÁEZ-LLORENS et al., 2000). No entanto, o uso indiscriminado dessas substâncias tem resultado no aparecimento de linhagens de patógenos resistentes. A resistência bacteriana vem sendo considerada como um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso terapêutico (FERREIRA; CRUZ; FIGUEIREDO, 2011).

Nos últimos anos a comunidade científica tem demonstrado aumento no interesse pela busca de novos agentes antimicrobianos, provenientes de diferentes fontes, para combater a resistência microbiana (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). A demanda dos consumidores por produtos seguros e naturais, resultou em diversas pesquisas para avaliar a viabilidade de preservação com novos agentes antimicrobianos, extraídos a partir de matrizes vegetais (GOÑI et al., 2009).

Segundo Burt (2004), não existe apenas um mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos vegetais, uma vez que podem conter em sua composição uma enorme gama de compostos complexos e estruturalmente

diferentes. Possíveis mecanismos envolvem a degradação da parede da célula, danos à membrana citoplasmática, danos a proteínas de membranas, vazamento do conteúdo das células, coagulação do citoplasma e a depleção do transporte de prótons ativos.

Para identificação da capacidade antimicrobiana, testes foram padronizados pela Organização Mundial de Saúde, a fim de padronizar a diluição em caldos e testes de sensibilidade antimicrobiana em meios de cultura com diluição em ágar. A metodologia, descrita pela *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, consiste na medição dos diâmetros de cada zona de inibição e comparação com a concentração mínima inibitória (CIM) obtida por testes de susceptibilidade de diluição em ágar ou caldo (SCHWALBE; STEELE-MORRE; GOODWIN, 2007).

Diversos estudos relatam a eficácia de extratos e óleos essenciais de diferentes matrizes vegetais, no controle do crescimento de uma vasta gama de micro-organismos (ELLER et al., 2015; MABONA et al., 2013; MICHELIN et al., 2005; NEDOROSTOVA et al., 2009).

Extratos de folhas da bardana, obtidos por extração convencional, tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada por Lou et al. (2010b) frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados mostraram que os extratos inibiram efetivamente o crescimento de todos os micro-organismos. Essa propriedade foi atribuída a grande concentração compostos fenólicos identificados no extrato (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido benzoico, ácido p-cumárico, entre outros). Outros relatos da atividade antimicrobiana de extratos obtidos de diferentes frações da bardana já foram mencionados (item 2.2).

No entanto, até o momento, não foram encontrados relatos na literatura acerca da avaliação das propriedades dos extratos das folhas da bardana obtidos via extração com fluido supercrítico ou líquido pressurizado.

1.6 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Este sistema é formado por um conjunto de aproximadamente 35 proteínas séricas ou associadas a membranas celulares que têm por função

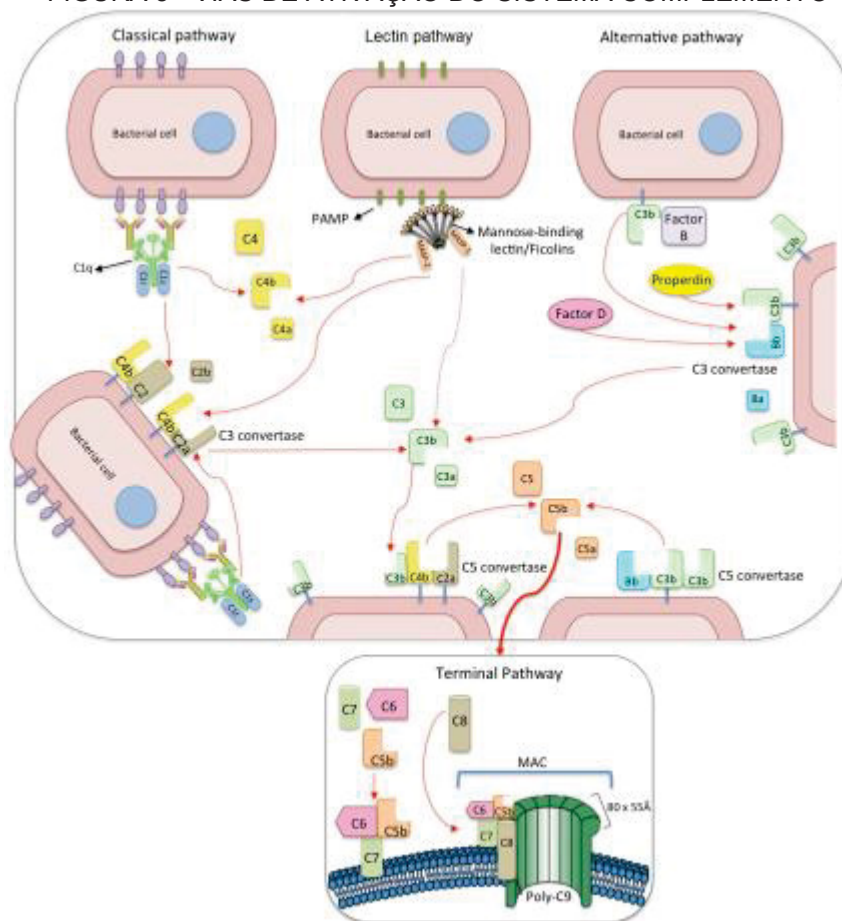
proteger o organismo de agentes agressores, participando do desenvolvimento da imunidade. Quando o organismo identifica agentes invasores, como micro-organismos, tem por natureza desenvolver complexos imunes pela alta produção de anticorpos contra determinados antígenos ou quando há um excesso de antígenos. Desta forma ocorre a ativação do sistema complemento. Como resultado de sua ativação alguns componentes do complemento se depositam sobre a superfície do patógeno responsável pela ativação, o que determina sua destruição (lise) e/ou sua eliminação por células do sistema fagocítico (BELTRAME et al., 2015; FRANK, 1988). A ativação do complemento pode ser iniciada através de três vias principais: clássica, alternativa e das lectinas (FIGURA 3).

A capacidade deste sistema em controlar as reações inflamatórias agudas e de produzir lesões letais nas membranas celulares constituem uma ameaça não apenas para os patógenos invasores, mas também às células e aos tecidos do hospedeiro (organismo). Desta forma, embora o sistema complemento seja de extrema importância para a defesa do organismo, sua ativação descontrolada pode acarretar danos a saúde. Devido a isso, a ativação do complemento é normalmente mantida sob controle pela ação de proteínas reguladoras que inibem ou inativam o complemento, assegurando que sua ativação seja proporcional à concentração e à duração da presença dos ativadores do complemento. Assim, as proteínas reguladoras protegem as células do hospedeiro contra o potencial deletério dos produtos de ativação do complemento (SHEN et al., 1997; WAGNER; FRANK, 2010).

Embora hajam as proteínas reguladoras naturais, ainda tem se identificado a influencia do sistema complemento em casos de doenças auto-imunes, indicando a necessidade de identificação de substâncias que apresentem potencial modulador (regulador) da ativação do complemento (SHEN et al., 1997; WAGNER; FRANK, 2010).

Substâncias naturais são amplamente conhecidas por suas propriedades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, analgésicas, entre outros. No entanto poucas são as fontes naturais conhecidas que apresentem potencial regulador do sistema complemento (BELTRAME et al., 2015; WAGNER; FRANK, 2010) e, desta forma, a investigação por novas substâncias capazes de modular este sistema apresentam elevada importância científica, podendo ser uma alternativa promissora para tratamentos terapêuticos, especialmente para as doenças inflamatórias autoimunes.

FIGURA 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Beltrame et al. (2015)

1.7 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma etapa extremamente importante para a separação, identificação e utilização de compostos com alto valor biológico obtidos de diferentes matrizes vegetais. Do mesmo modo, a escolha do método de extração a ser aplicado para determinada matriz é fundamental para que se obtenha um alto rendimento do extrato, assim como pureza dos compostos de interesse (DANLAMI et al., 2014).

Vários são os métodos de extração e a escolha de qual empregar varia de acordo com a matriz vegetal submetida ao processo. Métodos convencionais como a destilação por vapor d'água e a extração por solventes orgânicos, são os mais comuns de serem aplicados. As técnicas mais utilizadas para a extração de óleos essenciais e extratos vegetais incluem Soxhlet, hidrodestilação e a maceração com álcool (WANG; WELLER, 2006). Porém, estes métodos trazem consigo inconveniências e

limitações do processo que estão relacionadas a alteração da composição dos extratos podendo torná-los produtos de menor eficácia biológica. Normalmente esses processos necessitam de longo tempo de extração e grandes volumes de solventes, os quais são restritos devido à sua toxicidade, já que os extratos vegetais por vezes são utilizados em alimentos. Além disso, muitas vezes apresentam baixo rendimento e extratos de baixa seletividade, devido a presença de componentes termicamente sensíveis que são deteriorados pelo aquecimento da matéria-prima (DANLAM I et al., 2014).

As limitações dos processos convencionais, combinadas ao aumento da demanda de componentes bioativos de óleos essenciais e extratos vegetais, levaram a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias de extração que contornassem as desvantagens apresentadas pelos métodos convencionais. Dentre elas se inclui a extração com fluido supercrítico e a extração com líquido pressurizado.

1.7.1 Extração por solventes orgânicos

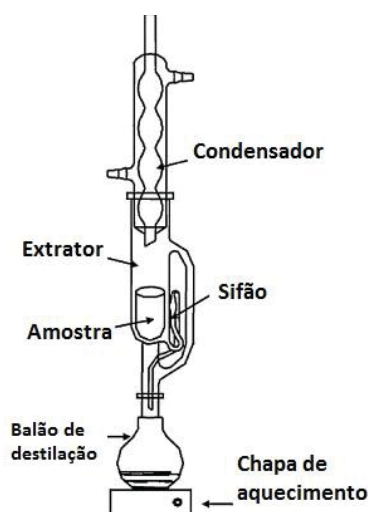
A extração por solventes orgânicos é um dos métodos mais antigos utilizados em processos de separação. Esse processo é comumente empregado para a obtenção de extratos de grãos, oleaginosas, e tecidos biológicos, devido à sua natureza lipossolúvel (SAINI; KEUM, 2016). A separação dos compostos das matrizes acontece por transferência destes de uma fase para outra (sólido-líquido, líquido-líquido) (RYDBERG, 1992; WENNERSTEN, 1992).

A extração por solventes de amostras sólidas, conhecida como “extração sólido-líquido”, consiste em manter o solvente em contato com a matriz vegetal por tempo suficiente para que ocorra a transferência dos constituintes solúveis presentes na planta. Dessa forma acontece a separação entre as fases sólida e líquida e para obtenção do extrato o solvente deve ser completamente evaporado (GEANKOPLIS, 2003; LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Previamente a etapa de extração, a matriz vegetal é triturada a fim de facilitar a penetração do solvente para que este, além de estar contido no interior das células sendo removido por difusão (etapa rápida), também estará em forma de uma camada em volta das partículas do material, sendo removido por simples dissolução (etapa lenta) (MORETTO; FETT, 1998). Uma técnica de extração por solventes orgânicos amplamente utilizada é por

extrator Soxhlet, desenvolvida em 1879 por Von Soxhlet. Há mais de um século tem sido considerado um método padrão, servindo de referência de comparação de outros métodos de extração “sólido-líquido” (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Um sistema convencional de Soxhlet, como mostrado na FIGURA 4, é basicamente composto por um extrator Soxhlet, acoplado a um balão contendo solvente, disposto sobre uma chapa de aquecimento. Dentro do extrator, a amostra sólida é colocada envolta por um material poroso. Com o aquecimento, o solvente entra em ebulição e o vapor gerado condensa quando entra em contato com o fluido refrigerante acima do extrator. Ao se condensar, o solvente goteja sobre a amostra e, aos poucos, o volume do condensado aumenta. Ao atingir o nível do cotovelo sifão, o solvente condensado retorna para o balão e arrasta consigo o material solúvel extraído. O solvente será novamente destilado e o ciclo pode ser repetido várias vezes até a completa extração (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; WANG; WELLER, 2006).

FIGURA 4 - ESQUEMA DO EXTRATOR SOXHLET CONVENCIONAL



FONTE: Adaptado de CASTRO; PRIEGO-CAPOTE (2010).

Os solventes mais utilizados são os hidrocarbonetos alifáticos (éter de petróleo e o n-hexano), álcoois (etanol e metanol), cetonas (acetona e metiletilcetona), ácido acético, acetato de etila, éter etílico e água (SIMÕES et al., 1999).

Assim como a maioria dos processos de extração, a extração soxhlet apresenta vantagens e desvantagens. As principais vantagens incluem: o repetido contato do

solvente com a amostra, mantendo o equilíbrio da transferência; manutenção de uma temperatura relativamente alta, contribuindo para a extração de compostos internos aos poros da matriz; nenhuma necessidade de filtração após a lixiviação e, além disso, o método soxhlet tem baixo custo e fácil operação. As principais desvantagens incluem: longo tempo de extração; grandes volumes de solvente, havendo a necessidade de uma etapa posterior para evaporação do mesmo; e possibilidade de decomposição de compostos termosensíveis devido ao longo tempo expostos a elevada temperatura (normalmente o ponto de ebulição do solvente) (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

1.8 EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

A ampla competitividade no campo de produtos naturais, onde a qualidade, a disponibilidade e os preços são fatores primordiais, torna a eficiência das técnicas de extração/separação extramamente importante. Assim, a extração por fluido supercrítico (SFE) tem ganhado espaço por ser um processo onde se pode obter produtos puros e de alta qualidade a partir de matrizes vegetais, principalmente devido a características como baixo fator de degradabilidade, poucos danos ambientais e fácil separação do solvente (DEAN; KHUNDKER, 1997; SILVA et al., 2009).

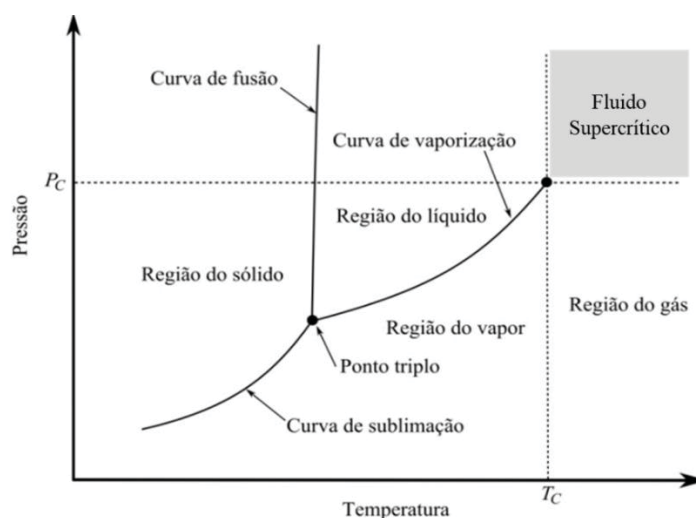
O processo de SFE é muito vantajoso e ambientalmente amigável em relação aos métodos de extração convencionais, o que o torna uma tecnologia promissora para indústrias de alimentos e de farmacos. No método SFE utiliza-se um fluido supercrítico como solvente, ou seja, fluidos em condições acima de seus pontos críticos de pressão e temperatura, para que dessa forma, extraia seletivamente componentes solúveis a partir de matrizes vegetais sólidas, como sementes, folhas e raízes.

Fluidos supercríticos têm uma maior difusividade e baixas densidade, viscosidade e tensão superficial, quando comparado a solventes orgânicos. Nas regiões próximas ao ponto crítico o fluido tem densidade e difusividade similar à de líquido, porém viscosidade comparável à dos gases. Assim, apresenta bom poder de solvatação e alta difusividade (BRUNNER, 2005). Cada fluido é caracterizado por um ponto crítico, definido em termos de temperatura crítica e pressão crítica. O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode existir

como vapor e líquido em equilíbrio (KNEZ et al., 2014; SAHENA et al., 2009; SHARIF et al., 2014).

Como função da temperatura e pressão a que é submetida, uma substância pura pode existir como gás, líquido, sólido ou como um fluido supercrítico, como apresentado no diagrama de fases na FIGURA 5.

FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FASES DE UM FLUIDO (T_C - TEMPERATURA CRÍTICA; P_C - PRESSÃO CRÍTICA)



FONTE: Adaptado de SMITH; VAN NESS; ABBOTT (2005)

As curvas representam as condições de temperatura e pressão onde duas fases coexistem em equilíbrio e, o ponto onde três fases coexistem, é chamado de ponto triplo. A curva onde gás e líquido estão em equilíbrio é definida como curva de vaporização, onde com o aumento da temperatura e pressão, o líquido torna-se menos denso, devido à expansão térmica, e o gás torna-se mais denso, devido ao aumento da pressão. Quando a curva de vaporização chega ao final, alcançando o ponto crítico, houve a igualdade nas propriedades intrínsecas (por exemplo, densidade, viscosidade, índice de refração, condutividade térmica) das fases líquido e gás, e já não se pode mais distingui-los. Nessas condições definem-se a temperatura crítica (T_C) e a pressão crítica (P_C) de um fluido. A T_C é a temperatura acima da qual um fluido não pode ser liquefeito por compressão isotérmica, enquanto a P_C é a pressão acima da qual o gás não pode ser liquefeito por resfriamento isobárico (CARRILHO et al., 2001; CARVALHO JUNIOR, 2004).

A SFE está baseada no poder de solvatação dos fluidos no seu estado supercrítico. Os fluidos supercríticos têm propriedade desejáveis que os tornam adequados para os processos de extração. As propriedades mais importantes são a sua densidade, viscosidade, difusividade, capacidade calorífica e a condutividade térmica. Altas densidades contribuem para maior solubilização de compostos, enquanto baixas viscosidades permitem sua penetração em sólidos com maior facilidade. Manter a temperatura e pressão acima do ponto crítico de um fluido, aumenta sua capacidade em penetrar na matriz sólida e extrair moléculas alvo. Ao controlar-se a pressão do fluido supercrítico, sua solubilidade pode ser alterada, permitindo um elevado grau de seletividade (PRONYK; MAZZA, 2009; PYO; KIM, 2014; VIGANÓ et al., 2016).

As principais vantagens da extração supercrítica em relação às técnicas convencionais de extração são a possibilidade do ajuste contínuo do poder de solvatação possibilitando a seletividade do solvente e a não utilização de solventes orgânicos poluentes, o que elimina a etapa de evaporação dos extratos para a remoção do solvente. Por conta disso, o emprego de fluidos supercríticos é considerado uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, em especial para as indústrias de alimentos e farmaceuticas (REVERCHON; MARCO, 2006).

Outras vantagens da extração supercrítica, podem ser destacadas (CARDOZO et al., 2007; MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996):

- a) A extração pode ser realizada em baixas temperaturas, possibilitando a extração de compostos naturais termicamente sensíveis;
- b) Os solventes utilizados são gasosos à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, sendo assim facilmente separados dos extratos e recuperados;
- c) Os solventes recuperados podem ser reutilizados, reduzindo o custo operacional.
- d) A maioria dos gases supercríticos empregados são fisiologicamente seguros e inertes;
- e) A qualidade dos extratos é elevada, uma vez que estes não sofrem alterações térmicas, hidrólise, oxidação, esterificação ou caramelização, podendo representar com maior fidelidade o material original.
- f) A força solvente é ajustada via compressão mecânica;

g) O processo permite a adição de co-solventes, fazendo a extração diferencial de solutos não polares até solutos de alta polaridade e ainda aumenta a solubilidade do material a ser extraído;

Como desvantagem da SFE pode-se citar a dificuldade de extração de compostos muito polares quando se utiliza CO₂ como solvente supercrítico. No entanto, este ponto pode ser melhorado com o emprego de modificadores adequados, como solventes orgânicos de alta polaridade (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007; RODRIGUEZ et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

1.8.1 Curvas de extração e rendimento

A representação da cinética da SFE é feita através da construção da curva de extração. Essa curva normalmente é apresentada plotando-se um gráfico da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. São vários os fatores que afetam o comportamento das curvas de extração, como vazão de solvente utilizada e tamanho da partícula formadora do leito. Desta forma, é difícil fazer a comparação entre curvas obtidas a partir de matérias-primas e equipamentos diferentes, mas as informações que elas podem fornecer como a duração da taxa constante de extração são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

A representação de uma curva de extração é apresentada na FIGURA 6. Geralmente as curvas de extração são divididas em três etapas principais e são determinadas pela massa de extrato em função do tempo de extração (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA; MEIRELES, 2002):

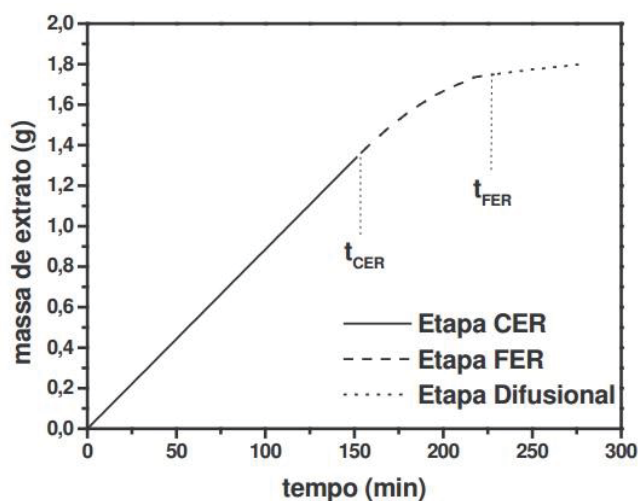
1) Etapa com velocidade constante de extração (CER, do inglês *Constant Extraction Rate*): a superfície externa da partícula está coberta com o soluto, que é chamado “soluto de fácil acesso”. Neste período a convecção é o mecanismo dominante e, portanto, a resistência à transferência de massa está na fase fluida. Esta etapa representa cerca de 50 % do rendimento total obtido no processo.

2) Etapa com velocidade decrescente de extração (FER, do inglês *Falling Extraction Rate*): falhas na cobertura de soluto sobre a superfície externa começam a aparecer dando início à difusão do soluto presente no interior da partícula. Nesta etapa

os mecanismos de transferência de massa por difusão e por convecção ocorrem simultaneamente. Até o final desta etapa o rendimento atinge 70 % de seu total;

3) Etapa difusional: a camada externa de soluto praticamente desaparece. Neste período a resistência à transferência de massa está na fase sólida.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA



FONTE: MARTINEZ (2005)

O rendimento de um processo de extração significa a máxima quantidade de material extraído de uma matriz a uma determinada temperatura e pressão. Esse rendimento é expresso pela razão entre a massa de extrato obtida e a massa de matéria-prima utilizada no processo, conforme a Equação 1.

$$R_0(\%) = \frac{m_{extrato}}{m_{matéria-prima}} \times 100 \quad (1)$$

Em que R_0 é o rendimento global da extração em porcentagem, $m_{extrato}$ é a massa de extrato obtida após o processo de extração, $m_{matéria-prima}$ é a massa de amostra utilizada no processo.

As propriedades do fluido supercrítico, selecionado como solvente do processo, influenciam diretamente no rendimento da extração, pois o valor de R_0 não depende apenas das características da matéria-prima, mas também da forma com que os compostos nela presentes interagem com o solvente. Entre estas propriedades está

a densidade do solvente, que afeta diretamente o seu poder de solvatação (MARTINEZ, 2005).

1.8.2 Fluidos supercríticos

Em um processo de extração supercrítica a escolha do fluido é um fator fundamental para a eficácia e rentabilidade econômica do processo de extração. Alguns fatores como disponibilidade comercial, custo, segurança e facilidade de manipulação devem ser considerados para seleção do fluido a ser utilizado. Alguns solventes que, comumente, são utilizados como fluidos supercríticos e as suas respectivas temperaturas e pressões críticas são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - PROPRIEDADES CRÍTICAS DE ALGUNS FLUIDOS UTILIZADOS COMO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.

Fluido	T _c (°C)	P _c (bar)
CO ₂	31,1	73,8
Água	374	217,20
Metano	- 82	45,40
Etano	32	48,20
Propano	97	41,9
Pentano	197	33,30
Etileno	9	49,70
Tolueno	319	40,60
Metanol	240	79,90
Etanol	241	60,60
Acetona	235	46,40
Éter etílico	194	35,90

FONTE: Adaptado de SANDLER (2006).

O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), devido às suas propriedades críticas baixas (31,1 °C e 73,8 bar) e alta seletividade, o que o faz ser considerado um solvente ideal para extrair componentes bioativos, além de não ser tóxico, não explosivo e estar prontamente disponível. Em comparação com as técnicas de extração convencionais, como extração por solventes orgânicos, a SFE com CO₂ diminui a degradação de componentes termosensíveis e o solvente pode ser completamente removido do extrato final com facilidade (NASCIMENTO et al., 2016; SAHENA et al., 2009).

Diversos estudos recentes onde CO₂ supercrítico foi utilizado como solvente no processo de extração supercrítica para obtenção de extratos oriundos de matrizes vegetais podem ser citados. Kavoura et al. (2019) empregaram CO₂ supercrítico para

obtenção de extratos das folhas de salvia grega (*Salvia fruticosa*). Mouahid et al. (2018) promoveram investigações experimentais e de modelagem da extração supercrítica de CO₂ de óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*). Diferentes outras matérias-primas vegetais tem sido submetidas ao processo de extração com este fluido, como folhas *Hibiscus sabdariffa* (PIMENTEL-MORAL; BORRÁS-LINARES; LOZANO-SÁNCHEZ, 2018), folhas de *Lippia graveolens* (SOTO-ARMENTA et al., 2019), folhas de citronela (GUEDES et al., 2018), gengibre (MESOMO et al., 2012, 2013), inflorescências de banana (*Musa paradisiaca*) (CORREA et al., 2016), frutos de *Campomanesia xanthocarpa* (CZAIKOSKI et al., 2015a), flores de *Eupatorium intermedium* (CZAIKOSKI et al., 2015b), dentre outras.

Porém, o processo de extração supercrítica utilizando CO₂ como fluido ainda é pouco estudado para a matéria-prima vegetal bardana. Até o momento um único estudo realizado por Rodriguez et al. (2018), onde foi avaliado o potencial extrativo deste método para as raízes da bardana, foi encontrado na literatura. Entretanto, o processo ainda não foi investigado para as folhas desta matéria-prima, evidenciando-se a importância do presente estudo.

1.8.3 Co-solventes (modificadores)

Mesmo em altas densidades, o CO₂ tem capacidade limitada para dissolver compostos de alta polaridade. A adição de modificadores pode melhorar a eficiência da extração aumentando a solubilidade do soluto. Normalmente a solubilidade do soluto no CO₂ supercrítico depende da presença de grupos funcionais na molécula, da massa molecular e da polaridade da mesma. Como o CO₂ é uma molécula com momento dipolo igual a zero, é uma substância apolar (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Desta forma, compostos orgânicos apolares ou levemente polares de baixa massa molecular são bastante solúveis, os compostos polares e de maior massa molecular são moderadamente solúveis, enquanto os compostos altamente polares e de maior massa molecular são dificilmente solúveis em CO₂ supercrítico puro (BRUNNER, 2005).

Para aumentar a solubilidade de compostos alvo polares e possibilitar a seletividade do processo de extração, tem sido proposto a adição de um solvente auxiliar ao CO₂, chamado de co-solvente ou modificador (PEREIRA; MEIRELES,

2010). Estes são compostos polares que, quando adicionados, mesmo em pequenas quantidades, podem induzir alterações substanciais das propriedades solventes do CO₂ supercrítico puro (SOLANA et al., 2014).

A utilização de co-solventes pode melhorar o rendimento dos extratos obtidos por SFE, aumentando a polaridade do solvente. Além disso, eles podem inchar as células de plantas, favorecendo a penetração e difusão do solvente na matriz sólida. A água e o etanol são os co-solventes conhecidos como seguros, benignos para o ambiente, podendo assim serem utilizados em processos de extração para aplicação em alimentos, devido à baixa toxicidade do etanol para o corpo humano (ASEP et al., 2013). O tipo de co-solvente a ser utilizado é determinado tendo em conta a afinidade entre os compostos alvo de co-solvente e, em alguns casos, para os compostos pertencentes à mesma classe química, o melhor co-solvente para extrair um composto pode não ser o ideal para outras substâncias. Poranto, os co-solventes são selecionados de modo a proporcionar o aumento das interações moleculares do solvente supercrítico com os compostos de interesse (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Os co-solventes mais utilizados em processos de extração SFE são o metanol e o etanol, os quais são capazes de realizar interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com moléculas do soluto contendo grupos polares (DE AZEVEDO et al., 2008; KOPCAK; MOHAMED, 2005).

Diversos estudos relatam o emprego de co-solventes como auxiliares no processo de extração com CO₂ supercrítico. Asep et al. (2013) avaliaram os efeitos de co-solventes polares sobre a extração da manteiga de cacau por SFE, e obtiveram que o etanol é o co-solvente mais eficiente para a extração da manteiga de cacau, em comparação com isopropanol e acetona.

Solana et al. (2014) avaliaram os extratos de rúcula obtidos por SFE puro e SFE + co-solvente e obtiveram que para esta matriz vegetal o ideal é a aplicação de uma extração sequencial utilizando primeiro água como co-solvente para extração de fenólicos e glucosinolatos e, em seguida, utilizando etanol como co-solvente para extração de lípidos.

Cruz et al. (2019) verificaram que a adição de etanol como solvente auxiliar ao CO₂ supercrítico potencializou a eficiência da extração na obtenção de extratos de folhas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) quando adicionado em uma proporção de 3:1 em relação a massa de matéria-prima.

Rodriguez et al. (2018) por sua vez avaliaram a influência do co-solvente metanol na extração supercrítica de raiz da bardana, quando adicionado ao processo em diferentes quantidades. Verificou-se neste estudo que a presença do co-solvente aumentou significativamente o rendimento final da extração quando comparado ao processo realizado com scCO₂ puro.

A utilização de co-solventes também foi avaliada para SFE de bagaço de uva (PORTO; DECORTI; NATOLINO, 2014; PORTO; NATOLINO; DECORTI, 2014), da casca de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) (VEGGI et al., 2014), na solubilidade de cafeína (KOPCAK; MOHAMED, 2005), entre outros.

1.9 EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO

O método de extração com líquido pressurizado (PLE - pressurized liquid extraction) consiste em submeter solventes orgânicos a condições controladas e elevadas de temperatura e pressão, com o intuito de extrair compostos a partir de matrizes sólidas ou semi-sólidas em um curto tempo e com reduzida utilização de solvente. Elevada temperatura e pressão aumentam o desempenho da extração, se comparada com técnicas que utilizam valores inferiores (CAMEL, 2001; MELLO et al., 2019).

A principal vantagem deste método é a possibilidade de utilização de temperaturas acima do ponto de ebulição do solvente, o qual ao ser pressurizado ainda se mantém em estado líquido. As principais variáveis deste processo são a temperatura e a pressão. Altos valores de temperatura aumentam a solubilidade, taxa de difusão e transferência de massa enquanto os valores de viscosidade e tensão superficial do solvente são menores do que aqueles à temperatura ambiente. Em adição, este método de extração, assim como a tecnologia supercrítica, utiliza ambiente livre de oxigênio e luz o que tem promovido sua ampla utilização na extração de compostos nutracêuticos (MUSTAFA; TURNER, 2011; STALIKAS, 2007).

A princípio, qualquer solvente orgânico poderia ser utilizado nessa técnica. Contudo, água e etanol têm sido os mais empregados para processos cujo objetivo final são as indústrias de alimentos e de produtos medicinais, e são adequados para a extração de compostos de polaridade mediana a alta, como os compostos fenólicos (GARCIA-MENDOZA et al., 2017; OTERO-PAREJA et al., 2015; PEREIRA et al.,

2019; TEIXEIRA et al., 2014). Uma boa alternativa é fazer uso de uma mistura destes solventes para melhorar a eficiência da extração, pois em uma mistura binária, um solvente pode melhorar a solubilidade da substância a extrair, enquanto o outro solvente aumentará sua dessorção. Neste sentido, a água pode auxiliar na quebra da interação matriz-soluto e o etanol diminuir a polaridade da mistura, fazendo com que compostos um pouco menos polares possam ser extraídos em comparação com a água pura (MUSTAFA; TURNER, 2011).

A técnica PLE consiste em adicionar a amostra no extrator, formando um leito fixo de extração, o qual será aquecido e pressurizado até atingir condição pré-desejada. O solvente utilizado deve ser pré-aquecido e bombeado para dentro do leito. Após um período de extração estática (se houver), pode-se iniciar a extração, controlando a vazão do solvente. Devido ao uso de solvente líquido, nesta técnica os extratos obtidos encontram-se no estado líquido e, desta forma, o mesmo deve ser separado do extrato por evaporação (evaporador rotativo), secagem em estufa ou liofilização, assim como nas técnicas convencionais.

Uma revisão realizada por Osorio-Tobón e Meireles (2013) mostra uma evolução na quantidade de artigos publicados, relacionados a PLE, indicando que sua maior aplicação tem sido em investigações na área de ciência e tecnologia de alimentos.

CAPITULO 2 - EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE *Arctium lappa* USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO + ETANOL: CINÉTICA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÕES DE BIOATIVIDADE

O conteúdo deste capítulo foi publicado na revista *The Journal of Supercritical Fluids*
DOI 10.1016/j.supflu.2018.06.011

RESUMO

Este estudo relata a extração de folhas de *Arctium lappa* usando scCO₂ com etanol como co-solvente (scCO₂ + EtOH) visando a recuperação de componentes bioativos. Os experimentos foram realizados variando a temperatura (40 – 80°C), pressão (15–25 MPa), e a relação entre a massa de etanol e a massa de CO₂ na etapa de extração estática, onde o rendimento da extração, composição, conteúdo total fenólico (TPC), atividade antibacteriana e antioxidante foram determinados. Análise GC/MS mostrou ftalato de diisocetil, acetato de amirina, acetato de lupeol e fitol como compostos principais. Observou-se a melhor relação entre rendimento máximo (6,09%) e atividades biológicas para o extrato obtido a 80°C e 15 MPa. Valores altos de atividade antioxidante também foram encontradas para os extratos obtidos a 80°C e 15 MPa, determinados pelo método DPPH e o método de redução de fosfomolibdênio. O mesmo extrato apresentou alto teor fenólico (35,51 mg_{GAE} / g_{extrato}). Alta atividade antibacteriana foi observada para todos os extratos obtidos com scCO₂ + EtOH contra a cepa *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Folhas de *Arctium lappa*; extração supercrítica; dióxido de carbono supercrítico; etanol; compostos de bioativos.

2.1 INTRODUÇÃO

Arctium lappa, comumente conhecido como bardana (no Brasil), é uma planta da família Asteraceae que tem sido considerada uma boa fonte de compostos bioativos (BURLANDO et al., 2010; CHAN et al., 2011; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; FERRACANE et al., 2010). Extratos obtidos de diferentes partes da *A. lappa* tem apresentando atividades biológicas e funções farmacológicas, incluindo atividade

antioxidante (JIANG et al., 2013; LIU et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2018), atividade antibacteriana (LOU et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2014), efeito neuroprotetor (TIAN et al., 2014), antiinflamatório (ALMEIDA et al., 2013; WU et al., 2014), antidiabético e anticâncer (CHAN et al., 2011). Desta forma, a *A. lappa* é considerada uma planta promissora para o tratamento de doenças crônicas, como câncer, diabetes, AIDS e, devido à crescente evidência de contribuições de compostos funcionais sobre uma variedade de benéficos para a saúde. As propriedades da *A. lappa* tem recebido crescente interesse científico.

Em estudos anteriores já relatados na literatura, extratos de diferentes frações de *A. lappa* foram obtidos por diferentes métodos de extração, tais como extração direta por solvente, extração de via Soxhlet utilizando como solventes etanol, de metanol e hexano (ZHAO et al., 2014), extração por ultrasom e microondas (LOU et al., 2012). No entanto, métodos convencionais de extração, como a extração Soxhlet, podem ser ambientalmente hostis devido a grande quantidade de solventes orgânicos utilizados, os quais geralmente são caros e potencialmente prejudiciais (OUÉDRAOGO et al., 2018). Outras desvantagens dos métodos convencionais incluem o longo tempo de processamento, baixa seletividade (ou seja, extratos de baixa qualidade) e, em alguns casos, componentes termicamente sensíveis veem a ser degradados devido ao intenso aquecimento, resultando em baixos rendimentos de extração e extratos de pior qualidade (DANLAMU et al., 2014). Essas desvantagens podem ser superadas com a aplicação de tecnologias não tradicionais. Entre essas tecnologias, a extração supercrítica com dióxido de carbono apresenta-se como um método ecologicamente correto, que oferece várias vantagens em relação às técnicas de extração convencional. Dióxido de carbono (temperatura crítica de 31 °C e pressão de 7,4 MPa) é o fluido supercrítico (scCO₂) mais utilizado, pois é um solvente inerte, não-tóxico, e que permite que a extração seja realizada em baixas temperaturas e com pressões relativamente baixas (BRUNNER, 2005). No entanto, a solubilidade do dióxido de carbono supercrítico é limitada aos materiais orgânicos não polares e não voláteis, e também à moléculas de pequeno tamanho (SOLTANI; MAZLOUMI, 2017). Porém, a adição de uma pequena quantidade de um solvente orgânico, como o etanol, pode aumentar solubilidade de compostos polares em um fenômeno conhecido como efeito de arraste (RUCKENSTEIN; SHULGIN, 2001). Recentemente, alguns autores (BABOVA et al., 2016; DA PORTO; NATOLINO, 2017; GUEDES et al., 2018; QUEIROZ; CAJAIBA, 2016; SANTOS et al., 2017; TRABELSI et al., 2016) mostraram

que a adição de um solvente polar ao scCO_2 pode melhorar a seletividade e aumentar o rendimento de extração de compostos de interesse de diferentes matrizes vegetais. O etanol melhora a solubilidade de uma variedade de compostos devido ao fato de possibilitar um aumento de forças químicas, principalmente as ligações de hidrogênio, ou as interações físicas dos solutos com o solvente polar. A adição deste solvente também pode causar um inchaço da matriz sólida, facilitando o transporte do soluto dos poros intersticiais para a superfície da matriz (HOLLENDER et al., 1997).

Uma maneira interessante de combinar um solvente polar com o CO_2 supercrítico é por meio do procedimento de líquido expandido a gás (GXL-gas expended liquid), no qual um solvente misto, composto por gás comprimido dissolvido em um solvente orgânico, é obtido. O uso de líquidos expandidos combina as propriedades benéficas dos gases comprimidos, como as do CO_2 , com as propriedades dos solventes orgânicos, levando a esta nova classe de solventes (os GXL). Devido à segurança e as vantagens econômicas oferecidas pelo dióxido de carbono, líquidos expandidos por CO_2 (CXL) são a tipo de solvente expandido mais comumente utilizado. Uma grande quantidade de CO_2 favorece a transferência de massa e, em muitos casos, a solubilidade do gás assim como a presença de solventes orgânicos polares, levam a um aumento da solubilidade de solutos sólidos e líquidos (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007).

Estudos sobre a extração da matriz vegetal *A. lappa* utilizando fluidos supercríticos e a avaliação das atividades biológicas de seus extratos foram pouco investigados na literatura. Em um estudo anterior apresentado por Rodriguez et al. (2018), investigou-se a extração de raízes de *A. lappa* com scCO_2 . Os resultados demonstraram que a adição de metanol ao processo permitiu que se atingissem melhores valores de rendimentos de extração (aproximadamente 8%), assim como obtiveram extratos com elevadas respostas para atividade antioxidante e conteúdos fenólicos totais.

Neste estudo o principal objetivo foi avaliar o potencial dos extratos das folhas de *A. lappa*, obtidos por extração supercrítica utilizando como solvente etanol expandido por CO_2 (processo do tipo CXL), em termos de atividade antioxidante, atividade antibacteriana e conteúdo fenólico total. As variáveis do processo, temperatura e pressão, foram investigadas para avaliação de sua influência nas respostas de rendimento da extração, composição química e a bioatividade dos extratos. Além disso, um modelo cinético de primeira ordem, anteriormente relatado

por Guedes et al. (2018), foi aplicado aos resultados para avaliar e melhor comparar as curvas de extração e os parâmetros do processo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Partes aéreas inteiras de bardana (*Arctium lappa*), incluindo folhas e caules, foram utilizadas como matéria-prima no presente estudo. As plantas foram coletadas em julho de 2016 em uma propriedade local na cidade de Ivaiporã (Estado do Paraná, Brasil). Todas as amostras utilizadas neste estudo pertencem a um único lote colhido.

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho possuíam grau analítico. O dióxido de carbono (> 99% de pureza na fase líquida) foi adquirido da White-Martins (Curitiba, Brasil). Foram utilizados os seguintes produtos químicos: etanol (99,8% de pureza, Sigma-Aldrich), reagente fenol Folin – Ciocalteu (2N, Sigma – Aldrich), DPPH (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich) e ácido gálico (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich). Todos os produtos químicos foram utilizados sem purificação adicional.

2.2.2 Preparação da amostra

As folhas de *A. lappa* foram colhidas, lavadas com água corrente e secas em estufa com circulação de ar a $50 \pm 2,0$ °C por 24 h. As amostras secas foram moídas em um processador de alimentos doméstico. Depois de processada, a matéria-prima foi separada granulometricamente a partir de diferentes peneiras da série Tyler acopladas a um agitador mecânico (Produtest, Estado de São Paulo, Brasil). O diâmetro médio das partículas foi estimado por meio do método descrito por Gomide (GOMIDE, 1983) considerando a fração mássica do material retido nas seguintes peneiras: 8 mesh (28,8%), 12 mesh (14,93%), 20 mesh (6,33%), 24 mesh (13,45%), 32 mesh (6,80%), 48 mesh (9,03%) e fundo (20,63%). Em seguida, para este estudo todas as frações mássicas foram misturadas e o material completo foi embalado em

sacos de polietileno de baixa densidade, selados a vácuo e armazenados em congelador doméstico a $-5,0 \pm 2,0$ °C até o momento de uso.

2.2.3 Determinação do teor de umidade e densidade da partícula

O teor de umidade (H) da amostra das folhas de *A. lappa* foi medido pelo método de destilação com tolueno de acordo com o metodologia AOCS (1994). Este método permite a distinção entre a água e o material volátil. Os valores foram calculados pela seguinte equação:

$$H = \left(\frac{V_{H_2O} \times \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

Onde: V_{H_2O} é o volume de fase aquosa, ρ_{H_2O} é a densidade da água e $m_{amostra}$ é a massa da amostra analisada.

A densidade real das folhas moídas foi medida pela técnica de picnometria com gás hélio no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

2.2.4 Extração Soxhlet

Extrações via Soxhlet foram realizadas utilizando etanol como solvente. Este procedimento foi tomado como parâmetro de referência de extração, visando comparação em relação a extração não convencional realizada com solvente comprimido (CXL). As extrações Soxhlet foram realizadas de acordo com um método adaptado da AOAC (1999), o qual consiste no uso de 5 g de amostra para 200 mL de solvente, mantidos em extração por um período de seis horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para melhor avaliação dos resultados. Ao fim das extrações, o solvente foi evaporado rotativamente e, em seguida, mantido em estufa com circulação de ar a $60 \pm 2,0$ °C, até obtenção de massa constante.

2.2.5 Extração por fluido supercrítico com adição de etanol

Os experimentos de extração foram feitos em uma unidade de extração supercrítica em escala de bancada (volume interno $V = 8,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3$, comprimento $L = 0,16 \text{ m}$, diâmetro $\Phi = 2,52 \times 10^{-2} \text{ m}$). O aparato experimental, assim como o procedimento utilizado neste estudo são os mesmos já descritos em trabalhos anteriores (BAUMGARDT et al., 2016; CORREA et al., 2016; MESOMO et al., 2012, 2013; RODRIGUEZ et al., 2018). Resumidamente, o sistema experimental consiste em um recipiente encamisado (extrator) acoplado a um banho ultratermostatizado, válvula agulha para controlar a taxa de fluxo do solvente dentro do extrator, uma bomba tipo seringa (ISCO, modelo 500D), sensores de pressão e temperatura e transdutores. Para o procedimento de extração supercrítica do presente estudo, utilizou-se como solvente uma mistura de CO_2 +etanol (sistema CXL). Para avaliar a influência da presença do etanol sobre os rendimentos da extração, diferentes razões mássicas iniciais (SMR) entre etanol e scCO_2 foram utilizadas (onde SMR representa a razão mássica entre etanol (em gramas) adicionado à matéria-prima, dividida pela massa inicial (em gramas) de CO_2 carregado no extrator no etapa de extração estática – tempo de confinamento). Portanto, o procedimento experimental consistiu em: aproximadamente 22 g da matéria-prima foi embebida (molhada) com etanol na proporção de massa de 2:1 (massa de etanol: massa de amostra), imediatamente essa mistura foi inserida no extrator. Em seguida, o extrator foi preenchido com CO_2 e, uma vez que o extrator tenha sido preenchido com a amostra/etanol e CO_2 , sob pressão e temperatura desejadas, o tempo de extração estática começou (período de confinamento). Ao final do período estático (o qual foi fixado em 60 min), deu-se início a extração dinâmica, carregada por CO_2 comprimido a uma vazão aproximada de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ (fluxo controlado pela bomba seringa a 10°C e pressão do extrator). Durante a extração dinâmica tanto a pressão quanto a temperatura foram constantemente controladas. A fim de determinar a influência destas duas principais variáveis da extração (temperatura e pressão), um planejamento experimental randomizado 2^2 com triplicata no ponto central foi desenvolvido. Desta forma, os experimentos foram realizados em temperaturas de 40, 60 e 80°C e pressões 15, 20 e 25 MPa. As curvas cinéticas das extrações das folhas de *A. lappa* foram determinadas a partir da coleta e pesagem de amostras do extrato em frascos âmbar a cada cinco minutos. Ao final das extrações, o extrato coletado foi submetido a estufa de circulação de ar com

temperatura controlada para remoção do etanol residual. As quantidades de extrato seco foram quantificadas gravimetricamente para cada amostragem.

2.2.6 Solubilidade aparente

A solubilidade aparente dos extratos (uma mistura de compostos solúveis na mistura scCO_2 + etanol) foi estimada com base no método dinâmico (FERREIRA et al., 1999; SANTOS et al., 2017; SOUSA et al., 2002; ZUKNIK et al., 2016), em que o solvente é saturado pelo soluto à medida que flui através do leito fixo, a uma taxa de fluxo constante. Neste estudo, embora o etanol seja carregado junto com a matéria-prima no leito fixo, consideramos o método dinâmico para estimar a solubilidade aparente dos extratos neste sistema solvente, considerando que a taxa de fluxo de CO_2 foi mantida constante ao longo do curso da extração. A solubilidade aparente foi estimada pela plotagem da massa do extrato (em base livre de etanol) em função da massa total do solvente comprimido (CO_2) utilizado. De acordo com o método dinâmico, as curvas de extração foram plotadas em linha reta, caracterizando a extração a taxa constante (etapa CER) (SOUSA et al., 2002; SOVOVÁ, 2005). A solubilidade foi então calculada pelos coeficientes angulares das retas obtidas ($R^2 \geq 0,97$).

2.2.7 Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS)

As análises de cromatografia foram realizadas no departamento de farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Todos os extratos foram analisados por GC-MS (Agilent 7890 A e Agilent 5975 C). Uma coluna capilar HP-5MS (30 m \times 0,25 mm id, 0,25 μm espessura de filme, fenil a 5 %/dimetilpolisiloxano a 95 %) foi utilizada. O hélio foi o gás de arraste e o volume de injeção foi de 1,0 μL . As temperaturas de fonte e quadrupolo foram 230 $^\circ\text{C}$ e 150 $^\circ\text{C}$, respectivamente. O espectrômetro de massa foi programado para varrer de 40,0 para 1000,0 m/z. A temperatura inicial da coluna foi de 50 $^\circ\text{C}$ e mantida por 1 min, esta temperatura foi aumentada a uma taxa de 2 $^\circ\text{C min}^{-1}$ até atingir 200 $^\circ\text{C}$, na qual foi mantida por 1 min. Os compostos foram identificados por comparação com a base de dados da biblioteca NIST-11, comparando os seus índices de retenção (RI) a uma série de n-alcanos (C8-

C40), e também através de comparação com dados já apresentados na literatura. Outra abordagem de processamento de dados utilizada para identificação dos compostos foi o software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System). Para confirmação dos compostos identificados, os dados da literatura foram comparados com os valores obtidos pela Equação (2.2):

$$IK_x = 100y + 100(z - y) \frac{t_{(r)x} - t_{(r)y}}{t_{(r)z} - t_{(r)y}} \quad (2.2)$$

Onde IK_x é o índice de Kovats, y representa o número de carbonos do padrão à esquerda do pico do composto avaliado, z representa o número de carbonos do padrão à direita do pico do composto avaliado, $t_{(r)x}$ representa o tempo de retenção do composto avaliado (min), $t_{(r)y}$ representa o tempo de retenção padrão à esquerda (min) e $t_{(r)z}$ representa o tempo de retenção do padrão (min).

2.2.8 Atividade antioxidante

2.2.8.1 Determinação do conteúdo fenólico total

O teor total de fenólicos (TPC – total phenolic content) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (ROSSI JR; SINGLETON, 1965), utilizando ácido gálico (GAE) como padrão. A mistura reacional foi composta por 0,1 mL de extrato (6 mg mL⁻¹), 7,9 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato) e 1,5 mL de carbonato de sódio a 20%, em frascos opacos. Os frascos foram agitados, deixados em repouso durante 2 horas e então a absorvância foi mensurada a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por grama do extrato (mg_{GAE} / g_{extrato}).

2.2.8.2 Ensaio espectrofotométrico DPPH

A atividade antioxidante foi determinada por meio de eliminações de radicais livres presentes nos extratos analisados, de acordo com o procedimento descrito por Mensor et al. (2001), utilizando o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Partindo

da solução estoque (5 mg mL^{-1}) de extrato etanólico, soluções com concentrações finais entre $100\text{--}1500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas. Alíquotas ($2,5 \text{ mL}$) de cada uma destas soluções foram transferidas para tubos de ensaio protegidos de luz e, em seguida, em cada tubo foi adicionado 1 mL de uma solução etanólica de DPPH ($0,3 \text{ M}$) recentemente preparada. As soluções foram homogeneizadas e mantidas em abrigo de luz à temperatura ambiente por 30 minutos, para desenvolvimento da reação. A absorbância ($\text{abs}_{\text{amostra}}$) foi mensurada a 518 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics, 2000 UV). Um branco foi preparado pela mistura de 1 mL de etanol com $2,5 \text{ mL}$ de cada solução contendo extrato e um controle negativo foi preparado pela mistura 1 mL da solução de DPPH e $2,5 \text{ mL}$ de etanol, a absorbância dessas soluções também foi mensurada ($\text{abs}_{\text{branco}}$ e $\text{abs}_{\text{controle}}$). O espectrofotômetro foi zerado com etanol ($99,9\%$) e α -tocoferol foi utilizado como controle positivo (padrão). Os resultados foram obtidos em triplicata e a atividade antioxidante (AA) foi calculada a partir da Equação (2.3).

$$\text{AA}(\%) = \left\{ \frac{\text{abs}_{\text{controle}}(\text{abs}_{\text{amostra}} - \text{abs}_{\text{branco}})}{\text{abs}_{\text{controle}}} \right\} \times 100 \quad (2.3)$$

A atividade também foi expressa como a concentração inibitória IC_{50} , que representa a concentração de extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$) necessária para reduzir em 50% o radical DPPH.

2.2.8.3 Método de redução do fosfomolibdênio

A atividade antioxidante total também foi determinada pelo método espectrofotométrico envolvendo reduções de fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Este método baseia-se na redução de Mo^{6+} - Mo^{5+} com a subsequente formação de um complexo fosfato- Mo^{5+} , que apresenta absorção máxima a 695 nm . Uma alíquota de $40 \text{ } \mu\text{L}$ da solução estoque (6 mg mL^{-1}) de extrato etanólico foi combinada com 3 mL de solução reagente (ácido sulfúrico $0,6 \text{ M}$, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). As amostras foram incubadas a $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min . Após o aquecimento das amostras, as mesmas foram arrefecidas até temperatura ambiente, e então foram centrifugadas. A absorvância das soluções foi

medida a 695 nm. O branco foi preparado misturando 3 mL de solução reagente e 40 mL de etanol. Os resultados foram expressos em miligramas de α -tocoferol por grama de extrato ($\text{mg}_{\alpha\text{-tocoferol}} \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$).

2.2.9 Avaliação da atividade antibacteriana

As propriedades antibacterianas dos extratos obtidos de folhas de *A. lappa* foram testadas pelo método do poço de ágar (BAUER et al., 1996). Foram testadas: uma cepa bacteriana Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e quatro cepas bacterianas Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Shigella flexneri* (ATCC12022). As cepas bacterianas selecionadas foram inoculadas em 10 mL de caldo de soja tripticaseína (TSB) a 37°C por 24 h. Suspensões de bactérias (100 μL) foram preparadas e ajustadas por comparação de acordo com a escala de turbidez McFarland, padrão nº. 0,5 e semeadas utilizando cotonetes estéreis em placas de ágar de soja tripticaseína (TSA). Os poços de ágar foram preparados com auxílio de tubos Duran esterilizados com um diâmetro de 7 mm. As amostras dos extratos foram dissolvidas em DMSO (1 g de cada amostra em 3 g de DMSO) e 40 μL dessas soluções foram adicionadas aos diferentes poços já formados nas placas de Petri. As placas foram mantidas à temperatura ambiente (20 °C) por 3 h para permitir a difusão da solução no meio de cultura antes do crescimento dos microrganismos e então, foram incubadas na posição vertical em 37 °C por 24 h. Como controle negativo, 40 μL de DMSO foram utilizados. A atividade antibacteriana foi avaliada pela formação ou não de zonas de inibição ao redor dos poços. Os ensaios foram realizados em triplicata e os diâmetros das zonas de inibição (em mm) foram medidos com paquímetro.

2.2.10 Análises estatísticas

Todos os resultados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente utilizando o software Statística 7.0® (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA), onde cada resposta foi avaliada de forma independente. Os dados experimentais foram

analisados por variância (ANOVA), e o teste de Tukey foi usado para identificar quais amostras diferem entre si a um nível de confiança de 95% (valor de $p < 0,05$).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Extrações

A matéria-prima (folhas de *A. lappa*) utilizada neste estudo apresentou umidade residual de $5,97 \pm 0,02$ %, diâmetro médio $(1,3 \pm 0,4) \times 10^{-3}$ m, densidade real de partículas de 1480 kg m^{-3} , densidade aparente de leito de 155 kg m^{-3} e, portanto, uma porosidade do leito de partículas de 0,90.

As extrações foram realizadas utilizando-se cerca de $22 \pm 0,2$ g de amostra e uma taxa de fluxo de scCO_2 de $2,0 \pm 0,3 \text{ mL min}^{-1}$, para todos os experimentos. As condições experimentais utilizadas para obter extratos de *A. lappa* utilizando scCO_2 + EtOH (CXL) estão apresentadas na Tabela 2 onde os dados de rendimento de cada extração, os valores de densidade de CO_2 para cada condição de extração, os valores de eficiência de extração (calculados usando a extração Soxhlet como referência), e a solubilidade aparente estimada, também são apresentados. Além disso, os resultados obtidos foram comparados com os valores obtidos na extração do aparelho Soxhlet com etanol.

Na Tabela 2 é possível verificar o baixo rendimento de extração (1,39 %, experimento 1) alcançado para a extração realizada sem a adição de etanol (ou seja, extração apenas com scCO_2 como solvente). Comparando com o resultado obtido ao se adicionar etanol, em uma mesma condição de extração (20 MPa e 60 °C), é possível perceber que o rendimento de extração foi significativamente melhorado (4,84 %, experimento 4). Estes resultados mostram o efeito positivo e significativo do etanol sobre o rendimento da extração. Esta melhora pode ser explicada principalmente pelo fato de que a presença de etanol provoca um aumento na polaridade da mistura de solventes (scCO_2 + EtOH), favorecendo a recuperação (extração) de moléculas polares (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007). A eficiência do etanol na obtenção de extratos de folhas de *A. lappa* é confirmada pelo alto rendimento atingido na extração pelo aparato Soxhlet, onde alcançou-se $11,40 \pm 0,73$ % de rendimento.

TABELA 2 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E SOLUBILIDADE PARA EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE *A. lappa* UTILIZANDO scCO₂ + EtOH (GXLS).

Exp	P (MPa)	T (°C)	SMR (g _{EtOH} /g _{CO2})	Proporção do co-solvente (g _{etanol} /g _{matéria-prima})	Tempo de extração (min)	Densidade do CO ₂ (kg m ⁻³) ^{\$}	Vazão de CO2 (kg h ⁻¹) ^{**}	Rendimento (%) ^{***}	Φ	Solubilidade aparente (g _{ext} g _{solv} ⁻¹)
1 [#]	20,0	60	0	0:1	140	723,68	0,1176	1,39	12,19	0,0013 ^h
2	20,0	60	0,33	1:1	50	723,68	0,1176	3,04	26,66	0,0182 ^d
3	20,0	60	1,88	3:1	50	723,68	0,1176	5,68	49,82	0,0124 ^f
4 [*]	20,0	60	0,85	2:1	50	723,68	0,1176	4,84 ^c ± 0,080	42,46	0,0195 ^c ± 0,00060
5	15,0	40	0,85	2:1	50	780,23	0,1145	3,96 ^d ± 0,010	34,74	0,0137 ^e ± 0,00020
6	25,0	40	0,85	2:1	75	879,49	0,1202	3,84 ^d ± 0,190	33,68	0,0101 ^g ± 0,00050
7	15,0	80	0,85	2:1	40	427,15	0,1145	6,09 ^b ± 0,340	52,89	0,0345 ^a ± 0,00010
8	25,0	80	0,85	2:1	40	686,22	0,1202	6,61 ^b ± 0,100	57,98	0,0259 ^b ± 0,00080
Soxhlet	-	-	-	-	360	-	-	11,40 ^a ± 0,730	100	-

Experimentos em triplicata são apresentados como valores médios e desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05).
#Sem etanol.
* Ponto central do planejamento experimental avaliado (2²).
\$ Valores estimados usando a densidade de CO₂ na temperatura e pressão de cada condição de extração.
** Valores estimados usando a densidade de CO₂ à 10°C e à pressão de cada condição de extração (condições estabelecidas na bomba).
*** Massa de extrato pela massa de matéria prima utilizado × 100.
Φ eficiência de extração definida como a massa do extrato (g) obtida ao final da extração por massa do extrato (g) obtido pela extração Soxhlet × 100.
SMR: relação inicial de massa de etanol para massa de CO₂ (etapa de extração estática).
FONTE: A autora (2018).

Os experimentos de 4 a 8 (Tabela 2) referem-se as condições de extração determinadas pelo planejamento experimental (2²). Todas as extrações deste delineamento foram realizadas em triplicata, com o objetivo de avaliar o real efeito da temperatura e da pressão, em uma condição fixa entre a razão mássica de etanol e amostra (fixada em 2:1 m/m), e também fixando-se a razão mássica inicial entre etanol e CO₂ (SMR fixo em 0,85:1 m/m), no período de extração estática (confinamento). Nestas condições, apenas a variável temperatura foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) sobre os resultados de rendimentos de extração. É possível verificar que nas extrações realizadas a uma temperatura fixa e variando a pressão (experimentos 5–6 e 7–8, Tabela 2), os rendimentos de extração não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$), porém ao comparar-se as extrações realizadas a uma pressão fixa e variando a temperatura (experimentos 5 e 7, 6 e 8), aumentos significativos ($p < 0,05$) nos rendimentos de extração são observados.

De acordo com as condições experimentais apresentadas na Tabela 2, a condição de extração que permitiu maior alcance em termos de rendimento (6,61 %, experimento 8) foi a 25 MPa e 80 °C, correspondente aos maiores valores de pressão e temperatura avaliados. Entretanto, esse bom rendimento não foi significativamente diferente do resultado de rendimento obtido pela extração carregada a 15 MPa e 80°C (6,09 %, experimento 7). Os menores rendimentos extração (3,96 e 3,84 %) foram obtidos em experimentos carregados em ambas pressões de 15 e 25 MPa, porém associadas ao menor nível de temperatura (40 °C) investigado, respectivamente. Ressalta-se que a solubilidade aparente estimada nessas condições (0,0137 e 0,0101 $g_{ext} g_{solv}^{-1}$) foram as menores encontradas, enquanto que os valores obtidos para as condições de pressão a 15 e 25 MPa associadas a 80 °C (0,0345 e 0,0259 $g_{ext} g_{solv}^{-1}$, respectivamente) foram os maiores valores de solubilidade encontrados. Assim, confirma-se que a temperatura é o fator de maior influência sobre as extrações.

A fim de uma maior compreensão das extrações com scCO₂ + EtOH, todas as curvas globais de extração (curvas cinéticas) obtidas no leito compactado foram modeladas por meio de um modelo empírico de primeira ordem (Eq. (2.4)), como proposto e apresentado em nosso trabalho anterior (GUEDES et al., 2018). Os parâmetros do modelo cinético (Y_e , k) foram ajustados usando o método de otimização de Levenberg-Marquardt (EDGAR; HIMMELBLAU, 1989), minimizando a função objetivo dada pela soma das diferenças quadraticas entre os valores de rendimento

de extração experimental e calculado (Y). Estes calculos foram realizados utilizando o software Statistica 7.0.

$$Y = Y_e [1 - \exp(-kt)] \quad (2.4)$$

Como mencionado anteriormente por Guedes et al. (2018), tal abordagem permite uma visão abrangente dos resultados da extração, pois resume os diversos dados cinéticos por condição de operação, em apenas dois parâmetros do modelo (k e Y_e). O primeiro deles é a constante de taxa de extração (k) que representa uma combinação de fatores externos e internos de resistência de transporte de massa, enquanto o segundo é o rendimento de solutos recuperados em condições de equilíbrio (Y_e). Na Tabela 3 resume-se o parâmetro do modelo cinético obtido em cada condição de extração. Pode ser visto que esta abordagem é capaz de representar todas as condições de extração variando a temperatura, pressão e adição de etanol.

TABELA 3 - CONDIÇÕES OPERACIONAIS E PARÂMETROS AJUSTADOS DA EQUAÇÃO (2.4) PARA AS EXTRAÇÕES DE *A. lappa* COM scCO₂+ETANOL.

Experimento	P (MPa)	T (°C)	SMR (g _{EtOH} g _{CO2} ⁻¹)	$k \pm U_{k,95} \times 10^4$ (s ⁻¹)	$Y_e \pm U_{Y,95}$ (%)	R ²
1 [#]	20,0	60	0	0,84 ± 0,66	3,01 ± 1,79	0,97
2	20,0	60	0,33	11,00 ± 3,61	3,66 ± 0,41	0,98
3	20,0	60	1,88	5,03 ± 2,01	7,17 ± 1,54	0,98
4*	20,0	60	0,85	6,57 ± 2,13	6,01 ± 0,95	0,98
5	15,0	40	0,85	6,08 ± 1,25	4,83 ± 0,49	0,99
6	25,0	40	0,85	4,60 ± 0,39	4,39 ± 0,17	0,99
7	15,0	80	0,85	10,19 ± 5,25	7,07 ± 1,54	0,97
8	25,0	80	0,85	9,05 ± 2,49	7,42 ± 0,76	0,98

*Ponto central do planejamento experimental avaliado.

[#] Sem etanol.

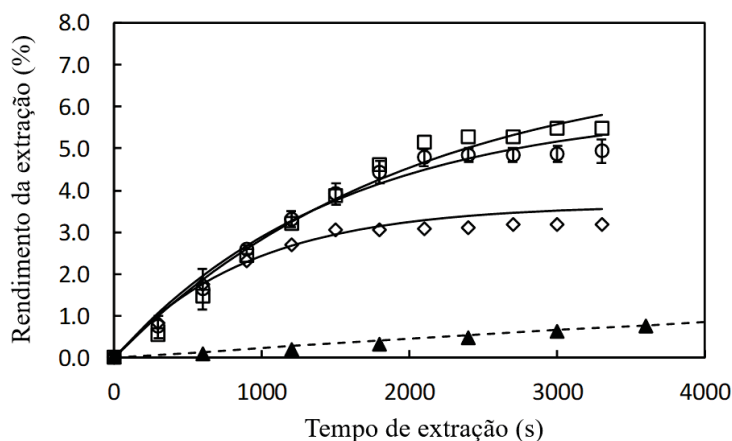
$U_{k,95}$ incerteza expandida.

FONTE: A autora (2018).

Em extrações de leito fixo com fluidos comprimidos, é importante o estabelecimento de uma taxa de fluxo do solvente em que o soluto seja saturado, já que em baixas vazões ocorre efeito de dispersão axial que interfere durante o processo, enquanto que usando altas taxas de fluxo, o tempo de contato entre solvente e soluto é curto e pode não ser suficiente para a saturação do solvente (SANTOS et al., 2017; ZUKNIK et al., 2016). Neste trabalho, fixou-se a taxa de fluxo

de CO_2 em 2 mL min^{-1} (medido nas condições da bomba, a 10°C e pressão de cada condição de extração), baseando-se em estudos anteriormente realizados pelo grupo. A FIGURA 7 mostra as curvas globais de extração para os experimentos com diferentes proporções iniciais de etanol em relação à massa de CO_2 (SMR) avaliadas no recipiente de extração para a etapa de extração estática (tempo de confinamento), cujos valores variaram de 0 a 1,88 (massa de EtOH por massa de CO_2), a 60°C e 20 MPa. Por meio destes resultados observa-se que o etanol adicionado ao scCO_2 aumentou o rendimento da extração de 1,39 % para 5,68 %, a uma temperatura fixa (60°C) e pressão (20 MPa), mostrando a alta eficiência da adição de etanol na mistura GXL. O adição de etanol a scCO_2 leva a um aumento na polaridade da mistura de solventes, que favorece a remoção dos solutos polares das folhas da *A. lappa* (matriz sólida), alterando as propriedades do solvente (mistura fluida) como difusividade, densidade e viscosidade (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007; SANTOS et al., 2017; SOLANA et al., 2014).

FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL EM CO_2 (NA ETAPA DE EXTRAÇÃO ESTÁTICA) NAS EXTRAÇÕES DE *A. LAPPA*: CURVAS DE EXTRAÇÃO NA RAZÃO INICIAL ETANOL/ CO_2 (SMR) DE (▲) SMR = 0; (◇) SMR = 0,33; (○) SMR = 0,85 E (□) SMR = 1,88, A $T=60^\circ\text{C}$ E $P=20 \text{ MPa}$. O SÍMBOLOS SÃO DADOS EXPERIMENTAIS E LINHAS CONTÍNUAS E TRACEJADAS SÃO VALORES CALCULADOS USANDO O MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM.

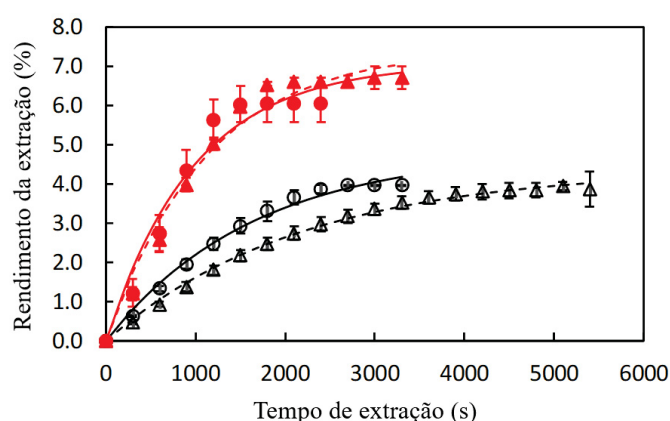


FONTE: A autora (2018)

Conforme apresentado na Tabela 2 (experimentos 1-3), o aumento da proporção de massa de etanol para a massa de CO_2 (SMR) na etapa de confinamento favoreceu significativamente o rendimento de extração até um SMR de 0,85, variando ligeiramente até 1,88, contrariamente aos valores de solubilidade aparente que diminuiriam em SMR 1,88. Em geral, o etanol aumenta a solubilidade dos extratos

ricos em compostos polares e, conseqüentemente, levam a um aumento no rendimento da extração (DALMOLIN et al., 2010; JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007). No entanto, há uma discussão sobre o efeito da estrutura celulósica na solubilidade dos extratos obtidos por scCO_2 + etanol a partir de matérias-primas vegetais (RODRIGUES et al., 2002). A diminuição da solubilidade aparente pode ser explicada pelo excesso de etanol em relação a quantidade de sólidos (matéria-prima) nesta condição, onde visualmente pode ser percebido que a cama de sólidos foi completamente inundada pelo etanol. Portanto, a partir destes resultados adotou-se para as extrações deste estudo uma relação fixa entre a massa de etanol e a massa de CO_2 (SMR) de 0,85, mantendo a relação entre o etanol e a massa de sólidos de 2:1 (m/m). A FIGURA 8 apresenta uma comparação das curvas globais de extração, obtidas sob diferentes condições de temperatura e pressão, onde os valores experimentais são comparados com os valores calculados pelo modelo cinético. Para todas as condições de extração, pode-se notar que o simples modelo de primeira ordem foi capaz de correlacionar bem as curvas de extração para a recuperação de extratos de folhas de *A. lappa* obtidos com scCO_2 + EtOH.

FIGURA 8 - CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO DAS FOLHAS DE *A. LAPPA* UTILIZANDO SCCO_2 E ETANOL (SCCO_2 + ETOH) EM UMA RAZÃO FIXA ENTRE ETANOL E CO_2 (SMR) DE 0,88 A (○) 40°C E 15 MPA, (△) 40°C E 25 MPA, (●) 80°C E 15 MPA, E (▲) 80°C E 25 MPA. AS BARRAS REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO EXPERIMENTAL DAS TRIPLICATAS. SÍMBOLOS SÃO DADOS EXPERIMENTAIS E LINHAS CONTÍNUAS E TRACEJADAS SÃO VALORES CALCULADOS USANDO O MODELO CINÉTICO DE PRIMEIRA ORDEM.



FONTE: A autora (2018)

Os parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho, considerando a extração das folhas de *A. lappa* com scCO_2 + EtOH, foram da mesma magnitude dos obtidos por Guedes et al. (2018) para extração de solutos de folhas de citronela. Assim, pode-se

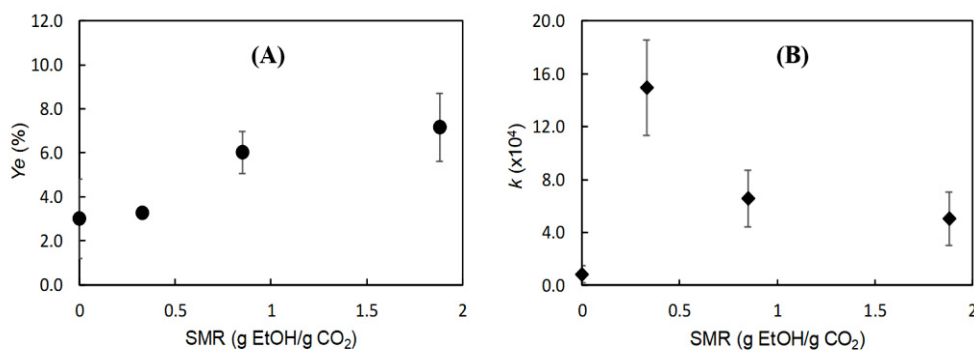
sugerir que os fenômenos de extração são similares para os processos de extração de solutos de matérias-primas vegetais (partes aéreas de plantas diferentes) utilizando o líquido comprimido composto por scCO_2 + EtOH como solvente. Guedes et al. (2018) mostrou que a adição de etanol na extração supercrítica trouxe importantes melhorias nos parâmetros de extração. Na Tabela 3 do presente estudo é possível observar o mesmo, onde a adição de etanol a 60°C e pressões similares (experimento 1 e 4) aumentaram ambos os parâmetros cinéticos k ($0,84 \pm 0,66 \text{ s}^{-1}$ a $6,57 \pm 2,13 \text{ s}^{-1}$) e Y_e ($3,01 \pm 1,79 \%$ para $6,01 \pm 0,95 \%$). Nas extrações com a adição de etanol, em uma mesma pressão, o aumento de temperatura (experimentos 5 e 7, 6 e 8) também favoreceu a melhora de ambos os parâmetros cinéticos.

A FIGURA 9 apresenta os parâmetros do modelo de primeira ordem usados para representar as curvas globais de extração obtidas a 20 MPa e 60°C e variando a relação massica entre etanol e CO_2 (SMR). Observa-se que, a uma condição fixa de temperatura e pressão, os Y_e aumentam constantemente e tendem a um valor máximo em maiores proporções de etanol (Fig. 9 (A)). Este valor máximo refere-se a um equilíbrio de rendimento da extração no caso limite do uso de etanol puro como solvente. A constante de extração de taxa (k) aumentou significativamente na extração com scCO_2 puro (SMR = 0). Pela Fig. 9 (B), nota-se que este parâmetro atinge um valor máximo para razão mássica de etanol (SMR) inferior a 0,5, indicando que as maiores taxas de extração ocorrem em menores proporções de etanol em relação a massa de scCO_2 . No entanto, dentro das condições avaliadas no presente estudo, a melhor condição de extração deve ser realizada na proporção de etanol superior a 0,85 para que se obtenha altos rendimentos de extração.

Em geral, pode-se observar a partir das curvas de extração obtidas neste estudo que a extração de compostos de folhas de *A. lappa* (matéria-prima) usando apenas scCO_2 como solvente não é eficiente, mas com a adição de um solvente polar (etanol, neste caso) aumenta-se significativamente a solubilidade dos compostos (YANG; WEI, 2015) na mistura de solventes (scCO_2 + EtOH) na etapa de extração estática. A presença de etanol também possibilita um aumento da acessibilidade aos solutos facilitando seu transporte, a partir da matriz sólida, pelo scCO_2 durante a extração dinâmica. Além disso, a adição de etanol possivelmente melhorou a área de superfície de extração na matriz sólida, devido à expansão do material pelas interações sólido-solvente e por afinidade e interações polares-polares entre o solvente e os compostos presentes na matéria-prima, bem como maior miscibilidade do gás, melhorando a

extração de compostos polares (JESSOP; SUBRAMANIAM, 2007; KONG et al., 2009).

FIGURA 9 - PARÂMETROS CINÉTICOS EM FUNÇÃO DA RELAÇÃO INICIAL ETANOL / CO₂ (SMR): (A) RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM EQUILÍBRIO (Y_E) E (B) TAXA CONSTANTE DE EXTRAÇÃO (K).



FONTE: A autora (2018)

2.3.2 Composição química dos extratos das folhas de *A. lappa*

Uma investigação do perfil de compostos fitoquímicos por cromatografia permitiu identificação da presença de lactonas, terpenóides e ésteres nos extratos de folhas de *A. lappa*. As composições relativas (%) dos principais compostos estão apresentadas na Tabela 4.

Entre os compostos identificados, o acetato de lupeol foi encontrado em maior quantidade (17–35 %). Este composto é um triterpeno, o qual é um amplo grupo de compostos naturais com considerável significância prática. Os triterpenos são importantes componentes estruturais das membranas das plantas. Estudos anteriores identificaram o lupeol em azeitonas, manga, folhas de aloe, ulmeiro, pêra japonesa, óleo de ginseng (SALEEM, 2009), folhas de carvalho (SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2015), caule de *Sterculia villosa* (DAS et al., 2017), fruto de laranja-osage (FILIP et al., 2015), o qual apresentou propriedades relevantes, como atividade anti-inflamatória, atividades antibacteriana, imunomoduladora e anticancerígenas. O diisooctil ftalato (DIOP) também foi encontrado em grande quantidade (5–29 %). Este composto é altamente plastificante, pode atuar como antimicrobiano e anti-incrustante (SANGEETHA; VIJAYALAKSHMI, 2011), já identificado também por Rodriguez et al. (2018) em extratos de raízes de *A. lappa* e por Jiajun et al. (2017) em raízes de tabaco.

Compostos de amirina foram identificados, e estes também são classificados como triterpenos. A amirina já foi encontrada em algumas plantas, como *Echinacea purpurea* (LEPOJEVIĆ et al., 2017), óleo de folhas de moringa oleífera (ZHAO; ZHANG, 2013), folhas de bambu (ZULKAFI et al., 2014) e em folhas de dente de leão (SIMÁNDI et al., 2002). Os triterpenos α -amirina e β -amirina tem sido estudados devido ao seu potencial biológico e farmacológico. Entre suas propriedades estão a atividade citotóxica e antioxidante, atividade antibacteriana, antinociceptiva e antidiabética (ABDEL-RAOUF et al., 2015; BARROS et al., 2011; FABIYI et al., 2012; NAIR et al., 2014; SOLDI et al., 2008; SUNIL et al., 2014). Além destes, também foi identificado o composto de fitol. Fitol é um diterpeno e pode atuar como antimicrobiano, anti-inflamatório, anticâncer e tem ação diurética (TYAGI; AGARWAL, 2016). Este composto se faz presente possivelmente devido à degradação da clorofila no processo extrativo (VAVILIN; VERMAAS, 2007).

De acordo com estes resultados, os compostos identificados nos extratos das folhas de *A. lappa*, apresentam várias atividades biológicas que podem justificar as boas propriedades, como atividade antibacteriana e antioxidante, encontradas neste trabalho. No entanto, a composição dos extratos pode ser influenciada pelas condições de extração, tais como pressão e temperatura, bem como pela técnica de extração utilizada. Percebe-se que nas extrações realizadas no ponto central do planejameto, bem como na extração em Soxhlet, muitos compostos não foram identificados. Para entender o comportamento do ponto central, mais estudos são necessários sobre as condições de extração para obtenção destes compostos específicos. No entanto, na extração Soxhlet, a temperatura pode ser responsável pela degradação de muitos compostos pois a matéria-prima é exposta a alta temperatura por um longo período de tempo (seis horas).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *A. lappa* OBTIDOS POR CO₂ SUPERCRÍTICO COM ETANOL COMO CO-SOLVENTE.

Pico	Compostos	RI ^a	RI ^b	Composição Relativa (%)						Soxhlet*
				15 MPa 40 °C	25 MPa 40 °C	15 MPa 80 °C	25 MPa 80 °C	20 MPa 60 °C ^c	20 MPa 60 °C [#]	
1	Piranona			0,45	0,28	0,69	1,42	nd	nd	nd
2	Ácido decanóico	1397	1386	0,62	nd	0,18	nd	nd	0,11	22,52
3	β-Eudesmol	1653	1654	0,26	0,26	0,42	0,36	nd	0,43	nd
4	Metil palmitato	1923	1926	0,45	0,43	0,34	0,54	nd	0,16	nd
5	1-(3-Metil-ciclopent-2-enil)-ciclohexano	1957	-	1,38	1,50	nd	2,02	nd	2,11	nd
6	Acido Hexadecanoico etil ester	1996	1996	0,78	0,74	2,37	0,98	nd	0,11	nd
7	Z-Fitol	2104	2114	4,12	4,00	5,30	4,43	8,01 ± 1,19	3,63	6,48
8	9-Ácido octadecenoico metil ester	2122	2116	0,59	0,57	1,72	0,14	nd	0,16	nd
9	Metil estearato	2123	2128	1,84	1,78	5,11	1,99	nd	nd	nd
10	Ácido linolenico etil ester	2133	2139	0,21	0,21	0,39	0,22	nd	0,16	nd
11	9-12- Ácido octadecadienoico etil ester	2172	2171	1,58	1,15	1,22	1,73	nd	nd	nd
12	3-Etil-5-(2'etil)octadecano	2416	2413	nd	0,98	0,20	0,93	nd	0,28	nd
13	Ácido Palmítico β-monoglicerideo	2417	2415	0,49	0,37	0,43	0,42	nd	0,20	nd
14	Fitalato Disocitlico	2425	-	26,108	29,42	12,36	14,20	10,79 ± 2,96	5,42	nd
15	Metil-7, 10, 13, 16-docosatetraenoato	2459	-	2,01	1,54	0,52	1,42	nd	nd	nd
16	Escaleno	2463	-	3,17	0,75	0,61	0,35	nd	0,68	nd
17	Vitamina E	2854	-	1,00	1,02	1,20	0,98	nd	1,70	nd
18	Stigmasterol	3227	3247	0,397	0,41	0,54	0,45	nd	0,37	nd
19	λ-sitosterol	3245	3342	1,6	1,57	2,03	1,64	nd	1,5	nd
20	β-amirina	3275	3312	1,30	1,29	1,37	1,23	nd	2,51	nd
21	α-amirina	3293	3354	0,66	0,40	0,43	0,30	10,33 ± 2,00	1,72	nd
22	9-19-Ciclolanostane-3,7-diol	3523	-	nd	0,42	0,51	6,45	nd	9,37	nd
23	Stigmast-5-em-3-il acetato	3532	-	nd	nd	nd	nd	23,42 ± 4,29	0,28	21,45
24	Acetato de amirina	3533	-	13,69	15,19	16,42	15,08	nd	21,56	nd
25	Acetato de lupeol	-	-	17,37	18,23	20,64	28,00	35,32 ± 6,20	25,33	nd

RI, índice de retenção; nd, não detectado

^a Índice de retenção calculado.^b Índice de retenção a partir de Pherobase, Chempidder and Aboutabl (SUNIL et al., 2014).^c Valores médios dos experimentos em triplicata e desvio padrão.

#Extração sem co-solvente.

* Extração Soxhlet com solvente etanol.

n.d.: não detectado.

FONTE: A autora (2018).

2.3.3 Atividade antioxidante

É difícil avaliar a atividade antioxidante de uma amostra baseado em respostas obtidas por um único método, pois um único método fornecerá informações básicas sobre as propriedades antioxidantes. Porém, uma combinação de métodos descreverá as propriedades antioxidantes do produto detalhadamente. Na Tabela 5 são apresentados os resultados da atividade antioxidante obtidos utilizando métodos de TPC, DPPH e redução do complexo fosfomolibdênio, para os extratos de *A. lappa* obtidos sob diferentes condições de temperatura e pressão utilizando scCO₂ com etanol (CXL), onde os resultados estão expressos em valores de média \pm desvio padrão. Como mencionado anteriormente, os resultados foram analisados estatisticamente e cada resposta foi avaliada independentemente.

2.3.3.1 Conteúdo fenólico total (TPC)

Neste estudo, o maior valor de TPC para os extratos de folhas de *A. lappa* foi obtido para o extrato proveniente da extração Soxhlet (59,69 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹), servindo como referência para os outros dados encontrados. No entanto, para as extrações supercríticas utilizando etanol na técnica CXL, os valores de TPC foram similares. Bons resultados foram encontrados para todos os extratos analisados. Entre as extrações que apresentaram maiores rendimentos, o maior valor de conteúdo fenólico foi obtido a 25 MPa e 80°C (42,72 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹), entretanto este resultado não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado as respostas obtidas para a maioria dos outros extratos, de acordo com o teste de Tukey. Este valor é semelhante aos resultados obtidos por Rodriguez et al. (2018), onde avaliaram-se extratos obtidos das raízes de *A. lappa* onde os valores de TPC variaram entre 49 a 94 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹. O conteúdo de compostos fenólicos mensurados neste trabalho podem ser considerados bons, por serem superiores aos resultados encontrados por Espinosa-Pardo et al. (2017), onde os valores de TPC variaram entre 18 a 21,8 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹ para extratos obtidos de bagaço de laranja via scCO₂ com os co-solventes etanol e água.

TABELA 5 - ATIVIDADES ANTIOXIDANTES MENSURADAS PARA OS EXTRATOS DE *A. lappa* OBTIDOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.

Experimento	Condições de Extração	Solvente	Co-solvente [#]	TPC (mg _{GAE} g _{extract} ⁻¹)	%AA (250 µg mL ⁻¹)	IC ₅₀ (mg _{extract} mL ⁻¹)	AA _{fosfom.} (mg _{tocopherol} g _{extract} ⁻¹)
1	20 MPa/60°C	CO ₂	-	36,14 ^c ± 3,61	12,61 ^f ± 0,14	1,033 ^a ± 0,002	80,10 ^e ± 16,5
2*	20 MPa/60°C	CO ₂	Etanol	42,44 ^b ± 2,58	30,57 ^{cd} ± 2,01	0,469 ^b ± 0,025	161,18 ^c ± 10,72
3	15 MPa/40°C	CO ₂	Etanol	44,81 ^b ± 1,15	28,92 ^d ± 0,65	0,424 ^c ± 0,002	212,11 ^b ± 16,7
4	25 MPa/40°C	CO ₂	Etanol	44,89 ^b ± 2,13	32,58 ^b ± 0,45	0,383 ^d ± 0,007	159,31 ^c ± 4,15
5	15 MPa/80°C	CO ₂	Etanol	35,51 ^c ± 0,15	29,58 ^d ± 0,23	0,467 ^b ± 0,003	133,9 ^d ± 3,78
6	25 MPa/80°C	CO ₂	Etanol	42,72 ^b ± 2,91	31,88 ^{bc} ± 0,27	0,444 ^c ± 0,004	164,26 ^c ± 8,42
7	Soxhlet	Etanol	-	59,69 ^a ± 3,01	46,41 ^a ± 0,71	0,273 ^e ± 0,001	300,39 ^a ± 18,54

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

* Ponto central do planejamento experimental avaliado.

[#] Proporção mássica de etanol em relação a matéria-prima fixada em 2:1.

FONTE: A autora (2018).

O mesmo acontece com os valores de TPC encontrados em extratos de outras matrizes vegetais, onde os valores medidos variaram de 14 a 39 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹ para extratos de Guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) e de 4 a 8 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹ para extratos de flor de *Eupatorium intermedium*, ambos também obtidos via scCO₂ (CZAIKOSKI et al., 2015a, 2015b). Os valores de TPC obtidos neste trabalho também foram superiores aos valores obtidos para Valadez-Carmona et al. (2018), onde os valores de TPC variaram entre 4 a 13 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹, para extratos obtidos de casca de cacau via scCO₂ utilizando etanol como co-solvente.

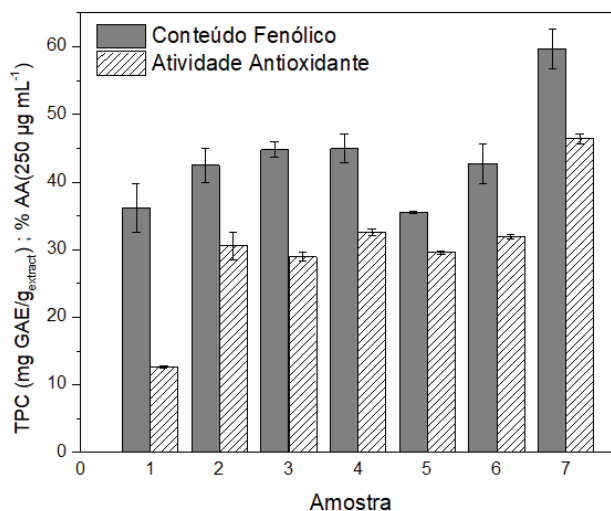
No entanto, no presente trabalho os valores de TPC encontrados a partir do extrato obtido sem adição de etanol como co-solvente do scCO₂ foi o menor (36,14 mg_{GAE} g_{extract}⁻¹). Esses resultados concordam com os dados apresentados por Martínez et al. (2012), os quais mencionaram que a recuperação de polifenóis a partir de materiais primas vegetais é influenciada pela solubilidade dos compostos fenólicos no solvente utilizado para o processo de extração. Além disso, a polaridade do solvente terá um papel fundamental no aumento da solubilidade dos fenólicos.

2.3.3.2 Método de ensaio DPPH

Frente ao ensaio de eliminação de radicais DPPH, as capacidades antioxidantes dos extratos de folhas de *A. lappa* obtidos por scCO₂ com etanol para uma concentração fixa em 250 µg mL⁻¹, apresentaram um maior potencial para o extrato obtido à pressão mais alta e temperatura mais baixa avaliadas (25 MPa / 40 °C), porém esta condição foi a que apresentou o menor resultado de rendimento de extração. Entretanto, esse resultado (32,58 %) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao valor encontrado (31,88 %) para o extrato obtido sob as maiores condições de pressão e temperatura avaliadas (25 MPa e 80 °C), o qual também foi o que apresentou melhor rendimento de extração (6,61 %). Embora este resultado apresente diferença significativa em relação ao extrato obtido a 15 MPa e 80 °C (29,58 %), esta pode ser considerada a melhor condição operacional, porque entre os dois melhores resultados de rendimento (Experimento 7–8, Tabela 2), a diferença na resposta de porcentagem antioxidante é pequena e, desta forma pode-se ajustar a pressão operacional de extração ao valor mais baixo para obter-se um

extrato de qualidade semelhante. Na FIGURA 10, são apresentados os efeitos das variáveis de processo no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante.

FIGURA 10 - CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL (TPC) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA-METODOLOGIA DPPH) NOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *A. lappa* OBTIDOS COM scCO_2 + EtOH. OS NÚMEROS DAS AMOSTRAS REFEREM-SE ÀS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA TABELA 5.



FONTE: A autora (2018)

Os resultados obtidos neste estudo podem ser considerados muito promissores quando comparados as respostas obtidas para outros extratos, como por exemplo, os resultados obtidos Czaikoski et al. (2015a), onde os autores encontraram valores variando de 4 a 8 % de atividade antioxidante para uma mesma concentração fixada em $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, para extratos de Guabiroba. Provavelmente a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *A. lappa* foi alta devido à extração de compostos polares que têm alta atividade antioxidante, onde sua recuperação foi favorecida pela presença do solvente polar. Como mostrado na FIGURA 10, o percentual de antioxidantes está relacionado com a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato, por exemplo, o maior TPC leva a uma maior % AA.

Os valores de IC_{50} também foram também calculados. No ensaio DPPH, quanto menor o IC_{50} , melhor é a capacidade de eliminação dos radicais livres, principalmente radicais peróxidos que são propagadores da auto-oxidação de moléculas de lipídios, e assim quebram a reação em cadeia do radical livre (LIM; LIM; TEE, 2007). No presente trabalho, o extrato que apresentou menor IC_{50} foi obtido por extração Soxhlet ($0,273 \text{ mg}_{\text{extrato}} \text{ mL}^{-1}$), indicando um possível efeito negativo da variável pressão necessária no processo de extração via scCO_2 . Contudo, entre os extratos obtidos por

scCO₂ com etanol, o menor IC₅₀ (0,383 mg_{extrato} mL⁻¹) foi encontrado para o extrato obtido nas condições de extração de maior pressão e menor temperatura (25 MPa e 40 °C). Para o extrato obtido sob mesma pressão, porém à temperatura mais elevada (25 MPa e 80 °C), houve um aumento de IC₅₀ (0,444 mg_{extrato} mL⁻¹), possivelmente devido à degradação térmica de compostos termolábeis presentes nesses extratos.

2.3.3.3 Método de redução do complexo fosfomolibdênio

Como apresentado na Tabela 5, para este método a maior atividade antioxidante dos extratos de folhas de *A. lappa* foi de 300,39 mg_{α-tocoferol} g_{extrato}⁻¹, para o extrato obtido por extração Soxhlet. Entre as extrações supercríticas, o maior valor encontrado (212,11 mg_{α-tocoferol} g_{extrato}⁻¹) foi para o extrato obtido na condição de menores pressão e temperatura (15 MPa e 40 °C). No entanto, este valor foi mensurado para o extrato que obteve menor resposta de rendimento (3,96 %). Como esta condição é inviável para o processo de extração, os melhores dados que combinam a atividade antioxidante total e rendimento de extração foram encontrados para o extrato obtido sob a maior pressão (25 MPa) e maior temperatura (80 °C) (164,26 mg_{α-tocoferol} g_{extrato}⁻¹). No entanto, o extrato obtido a 15 MPa e 80 °C também apresentou alto valor antioxidante (133,9 mg_{α-tocoferol} g_{extrato}⁻¹). Como estes resultados são muito próximos, vale a pena mencionar a opção de trabalhar com menor nível de pressão, minimizando assim o consumo de energia e gás.

A atividade antioxidante dos extratos de folhas de *A. lappa* determinados por redução do complexo fosfomolibdênico foi menor se comparado aos resultados obtidos por Mesomo et al. (2012) para extratos de gengibre obtidos com scCO₂, os quais variaram 854,42 a 931,67 mg_{α-tocoferol} g_{extrato}⁻¹. Esta diferença pode ser decorrente de uma influência negativa do etanol utilizado no processo de extração frente a esta metodologia. Como os compostos antioxidantes detectados em cada método não são necessariamente os mesmos, uma vez que os extratos são misturas de compostos, estes podem apresentar interações antagonistas ou sinergistas com os reagentes utilizados nos diferentes métodos antioxidantes (MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

2.3.4 Atividade antibacteriana

Os resultados de atividade antimicrobiana indicam que diferentes espécies bacterianas exibem diferentes níveis de sensibilidade frente aos extratos de folhas de *A. lappa* testados. Em todos os testes realizados com bactérias gram-negativas não foi observada nenhuma zona de inibição, indicando que as bactérias gram-negativas testadas foram completamente resistentes aos extratos obtidos. Este fato é atribuído à complexidade da parede celular desse grupo de micro-organismos, a qual possui uma membrana externa que fornece a superfície bacteriana uma forte característica hidrofílica e restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura de lipopolissacarídeos (NIKAIDO, 2003; VAARA, 1992). No entanto, a bactéria gram-positiva avaliada, *Staphylococcus aureus*, foi suscetível aos extratos de folhas de *A. lappa*, como apresentado Tabela 6. O tamanho da zona de inibição formado em testes antibacterianos, classificam o micro-organismo testado em categorias como: sensível, intermediário e resistente. De acordo com os Padrões de Desempenho para Suscetibilidade ao Disco Antimicrobiano (COCKERILL et al., 2012) para *S. aureus* os critérios para classifica-lo como sensível ao agente (extrato) testado, é o desenvolvimento de uma zona de inibição maior do que 21 mm.

TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *A. Lappa* FRENTE A ESPÉCIE BACTERIANA *Staphylococcus aureus*.

Extrato	Condição de extração	Diâmetro da zona de inibição (mm)
1 [#]	20 MPa/60°C	-
2 [*]	20 MPa/60°C	30,9 ^a ± 0,90
3	15 MPa/40°C	31,3 ^a ± 0,57
4	25 MPa/40°C	31,6 ^a ± 1,20
5	15 MPa/80°C	24,5 ^c ± 1,07
6	25 MPa/80°C	26,8 ^b ± 1,36
7	Soxhlet (solvente etanol)	28,3 ^b ± 0,85

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

[#] Amostra insuficiente para a quantificação da atividade antibacteriana.

^{*} Ponto central do planejamento experimental avaliado.

FONTE: A autora (2018).

O extrato com maior zona de inibição (31,60 mm) foi obtido pela extração realizada sob menor temperatura e maior pressão (40 °C e 25 MPa). No entanto, não foi estatisticamente diferente (p > 0,05) das demais amostras obtidas com outras condições (15 MPa / 40 °C e 20 MPa / 60 °C). Por outro lado, para os extratos obtidos com a temperatura mais elevada (80 °C) a zona de inibição foi menor em relação às demais. O mesmo ocorre com o extrato obtido por extração de Soxhlet com etanol.

Este fato indica que a atividade antibacteriana não sofreu qualquer influência pela variável pressão, mas é diretamente influenciada pelo aumento da temperatura.

2.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$ foi utilizado como solvente para obtenção de extratos das folhas de *A. lappa*, onde a adição de etanol melhorou significativamente a eficiência de extração. Um modelo cinético de primeira ordem foi capaz de correlacionar ($R_2 \geq 0,97$) as curvas cinéticas de extração para todas as temperaturas, pressões e razões mássicas iniciais entre etanol e CO_2 avaliadas. A técnica utilizada apresentou resultados promissores para a extração de compostos fenólicos das partes aéreas desta planta. Os parâmetros do processo (temperatura e pressão) foram avaliados em relação ao rendimento de extração, perfil químico, atividades antioxidantes e antibacterianas dos extratos obtidos. As melhores condições para o sistema $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$ em termos de rendimentos de extração foram obtidas para a maior temperatura (80 °C) e ambas pressões investigadas (15 e 25 MPa), indicando assim que a temperatura é o fator que mais afeta esse processo de extração supercrítica de folhas de *A. lappa*.

Embora os melhores resultados a cerca da atividade antioxidante e do conteúdo fenólico total terem sido encontrados pela extração realizada em pressão mais elevada (25 MPa), os extratos obtidos sob menor pressão, também apresentou boas respostas. Desta forma, o uso da condição de extração sob menor pressão é considerado o melhor cenário, pois possibilita a obtenção de extratos com boas propriedades biológicas, com menor gasto energético da bomba (menor pressurização). Desta forma, a melhor atividade antioxidante (29,58 %) e maior teor de compostos fenólicos (35,51 $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$) foram observados na extração realizada a 15 MPa, 80 °C, e em proporção de massa etanol para massa de matéria-prima de 2:1.

Todos os extratos avaliados apresentaram composição química semelhante e os compostos encontrados em concentrações mais altas foram o acetato de lupeol, acetato de amirina, ftalato de diisocetil e fitol.

Todos os extratos obtidos neste estudo apresentaram ação contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, no entanto todas as bactérias gram-negativas

testadas apresentaram resistência aos extratos. Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que os extratos obtidos das folhas de *A. lappa* usando scCO_2 + EtOH como solvente, apresentaram apreciáveis respostas frente ao conteúdo de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes. Espera-se que essas propriedades possam estar relacionadas à presença de vários terpenóides identificados nestes extratos, os quais provavelmente estejam influenciando diretamente tais resultados encontrados.

Em geral, os extratos obtidos sob 80 °C e 15 MPa apresentaram altas atividades biológicas, demonstrando que o processo de extração supercrítica utilizando scCO_2 com etanol em uma condição de solvente líquido expandido a gás (CXL) é uma tecnologia promissora para a obtenção de extratos das folhas de *A. lappa*.

CAPÍTULO 3 – EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE *Arctium lappa* COMO UM POTENCIAL REGULADOR DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO: AVALIAÇÃO DAS VIAS CLÁSSICA E ALTERNATIVA

RESUMO

O sistema complemento é um componente importante da resposta imune inata. No entanto, sua ativação exacerbada pode levar a condições prejudiciais como distúrbios autoimunes e inflamatórios. Plantas que inibem a ativação de complemento pode ser uma promessa no tratamento de doenças inflamatórias. Neste estudo avaliou-se o efeito dos extratos de folhas de *Arctium Lappa* na ativação das vias Clássica e Alternativa do complemento. Por amostragem, para investigação das vias clássica e alternativa, dois extratos foram avaliados: obtidos sob condições supercríticas utilizando $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$, a 40°C , 15 MPa (E1) e 25 Mpa (E2), onde a ativação clássica e alternativa foram avaliadas por meio do teste de fixação do complemento. O IC_{50} de E1, E2 e heparina foram respectivamente 28,26 , 20,12 e 92,54 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a a via classical, enquanto que para a via alternativa foram respectivamente 26,12; 27,70; 27,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ambos os extratos mostraram um efeito inibitório na ativação do complemento, e sugere-se que esta atividade esteja relacionada aos compostos identificados por CG/MS, com destaque para acetato de lupeol, acetato de amirina e fitol. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os extratos de folhas de *A. lappa* são potenciais candidatos para o tratamento de distúrbios inflamatórios que são relacionados ao sistema complemento.

Palavras-chave: Sistema complemento, via clássica, via alternativa, folhas de *Arctium lappa*, extração supercrítica, CO_2 supercrítico.

3.1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento é o principal fator frente a resposta imune inata. Este sistema é constituído por mais de 35 proteínas solúveis ou de membrana celular que podem ser ativadas por três vias: Clássica, Alternativa e Lectina (EVANS-OSSES; MESSIAS-REASON; RAMIREZ, 2013; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). Enquanto a via clássica é ativada principalmente pelo reconhecimento de complexos

imunes (GASQUE, 2004), a alternativa começa com a hidrólise espontânea do componente C3. Na via da lectina, as colecioninas ou ficolinas reconhecem os carboidratos dos microrganismos, como manose e compostos acetilados, induzindo sua ativação (WALLIS et al., 2010). Uma vez que o complemento é ativado, todas as vias culminam com a formação de convertases C3 e C5, levando à produção de anafilatoxinas e ao complexo de ataque à membrana (MAC) (MATHERN; HEEGER, 2015). Como consequência da ativação do complemento ocorrem vários processos biológicos, incluindo fagocitose, inflamação, quimiotaxia de leucócitos, liberação de histamina de mastócitos, espécies ativas de oxigênio leucocitário, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, citólise, entre outros (EVANS-OSSES; MESSIAS-REASON; RAMIREZ, 2013; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

É bem conhecido que o sistema complemento desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro (organismo) contra patógenos. No entanto, quando sua ativação se torna exacerbada ou descontrolada, ela pode levar a reações, como as observadas em doenças autoimunes e inflamatórias (RICKLIN et al., 2010) (RICKLIN et al., 2010; RICKLIN; LAMBRIS, 2013). Portanto, a modulação ou inibição da ativação do complemento é um alvo importante para terapias no tratamento de doenças inflamatórias como artrite reumatoide, lúpus, doença de Alzheimer, aterosclerose, psoríase, entre outras (WAGNER; FRANK, 2010). Apesar da variedade de produtos naturais com diversas atividades biológicas, incluindo antivirais, analgésicos, antitumorais, antialérgicos, antiinflamatórios e imunomoduladores (D'ORAZIO et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2010), compostos naturais com ação na ativação do complemento são escassos (WAGNER; FRANK, 2010).

A planta *Arctium lappa*, popularmente conhecida como Bardana, cresce em todo o território brasileiro com facilidade. Considerada uma espécie de erva daninha na região Sul, é popularmente usada para clarear a pele, bem como depurativa e anti-inflamatória (LIMA et al., 2006). Também é utilizada como infusão, decocção ou externamente como emplastro. Além disso, o bardana tem sido usado na medicina tradicional chinesa e em terapias alternativas na Europa, Ásia, América do Norte e do Sul (CHAN et al., 2011). Várias partes desta erva medicinal, incluindo raízes, folhas, sementes e frutos, têm diferentes atividades biológicas cientificamente comprovadas, tais como anti-inflamatório (CLAUDIU et al., 2018; KIM et al., 2018), antifúngico

(CLAUDIU et al., 2018), antitumoral (LOU et al., 2017). Além disso, Holetz et al. (2002) demonstraram que os extratos de *A. lappa* de plantas coletadas no sul do Brasil apresentaram atividade bactericida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A composição química do óleo essencial de folhas e raízes de *A. lappa* exibiu arctiol sesquiterpenoide, inulina, taninos, mucilagens, resina, polifenóis, ácidos graxos, minerais, carbonato, nitrato de potássio, composto antibiótico (semelhante à penicilina), um glicosídeo conhecido como lapina, fitoesteróis (sitosterol e estigmasterol) e ácidos orgânicos (ABOUTABL; EL-TANTAWY; SHAMS, 2013).

Como a ativação ou desequilíbrio do sistema complemento pode estar associado a vários distúrbios inflamatórios, a investigação de espécies vegetais que podem atuar como inibidores do complemento é de relevância. Além disso, o processo de extração supercrítica é a tecnologia mais apropriada para obter extratos com baixo solvente residual e baixo potencial tóxico final (SANCHEZ-CAMARGO et al., 2014; SILVA et al., 2008). Como apresentado em estudo anterior, extratos de *A. lappa* obtidos com uma mistura de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) e etanol apresentam boas propriedades antioxidantes, estes extratos foram escolhidos para avaliação do complemento (SOUZA et al., 2018).

Considerando que o Eculizumab e o inibidor da C1 esterase são os únicos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para a inibição do complemento, a busca por compostos naturais com efeito sobre vias do complemento é de grande importância. Este estudo tem como objetivo avaliar a ação de extratos supercríticos de *A. lappa* sobre a regulação da ativação das vias do complemento.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (nº 1.703.531).

3.2.1 Extratos supercríticos

A matéria-prima utilizada neste estudo compreendeu as partes aéreas de *A. lappa*, colhidas em uma propriedade local na cidade de Ivaiporã (Estado do Paraná,

Brasil). A matéria-prima (folhas de *A. lappa*) apresentou umidade residual de $5,97 \pm 0,02\%$, diâmetro médio de partícula de $(1,3 \pm 0,4) 10^{-3}$ m, e densidade real de 1480 kg m^{-3} , conforme relatado anteriormente por Souza et al. (2018). Os extratos de folhas de *A. lappa* foram obtidos por extração supercrítica utilizando uma unidade de extração supercrítica em escala laboratorial, onde CO_2 foi usado como solvente e etanol como co-solvente. A quantidade de etanol utilizada foi fixada em relação a massa de matéria prima em 2:1 (m/m). Os extratos utilizados para avaliação das vias clássica e alternativa, foram obtidos a 40°C sob duas condições de pressão: 15 MPa (E1) e 25 MPa (E2). Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (Agilent 7890A e Agilent 5975C), e o perfil de compostos fitoquímicos foi identificado por Souza et al. (2018)., como apresentado na Tabela 7.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE *A. lappa* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$.

Pico	Compostos	Composição Relativa (%)	
		15 MPa 40 °C	25 MPa 40 °C
1	Piranona	0,45	0,28
2	Ácido decanóico	0,62	nd
3	β -Eudesmol	0,26	0,26
4	Metil palmitato	0,45	0,43
5	1-(3-Metil-ciclopent-2-enil)-ciclohexano	1,38	1,50
6	Ácido Hexadecanoico etil ester	0,78	0,74
7	Z-Fitol	4,12	4,00
8	9-Ácido octadecenoico metil ester	0,59	0,57
9	Metil estearato	1,84	1,78
10	Ácido linolenico etil ester	0,21	0,21
11	9-12- Ácido octadecadienoico etil ester	1,58	1,15
12	3-Etil-5-(2'etil)octadecano	nd	0,98
13	Ácido Palmítico β -monoglicerideo	0,49	0,37
14	Fitalato Disocilico	26,108	29,42
15	Metil-7, 10, 13, 16-docosatetraenoato	2,01	1,54
16	Escaleno	3,17	0,75
17	Vitamina E	1,00	1,02
18	Stigmasterol	0,397	0,41
19	λ -sitosterol	1,6	1,57
20	β -amirina	1,30	1,29
21	α -amirina	0,66	0,40
22	9-19-Ciclolanostane-3,7-diol	nd	0,42
23	Stigmast-5-em-3-il acetato	nd	nd
24	Acetato de amirina	13,69	15,19
25	Acetato de lupeol	17,37	18,23

FONTE: Adaptado de Souza et al. (2018)

nd (não detectado)

3.2.2 Análises do sistema complemento

3.2.2.1 Vias Clássica e Alternativa

A ativação das vias clássica (VC) e alternativa (VA) do sistema complemento foi avaliada por testes de fixação de complemento adaptados de Alban et al. (2002). Os resultados obtidos foram expressos em relação à percentagem de hemólise, sendo comparados com diferentes controles, com ausência e presença de soluções-teste em diferentes concentrações

Solução tampão HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) (HB) suplementado com CaCl_2 0,11 mM e MgCl_2 0,5 mM (HBC), ou MgCl_2 7 mM e EGTA 10 mM (HBA), foram utilizados para avaliar a ativação de caminhos clássicos e alternativos, respectivamente. Os extratos E1 e E2 foram dissolvidos em HB com uma adição de 20% de dimetilsulfóxido (DMSO), alcançando uma concentração final de 1,1 mg ml⁻¹ e 0,9 mg ml⁻¹, respectivamente. Diferentes diluições de heparina (suína) foram utilizadas como controle negativo da hemólise.

3.2.2.2 Soro humano normal

Um pool de soro humano normal (NHS) foi preparado a partir de sangue periférico recém-coletado de 10 voluntários sadios do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e utilizado como fonte complementar. O sangue foi mantido sob refrigeração (2 a 8°C) até a coagulação total (15-30 min), centrifugado e o sobrenadante coletado, reunido e armazenado a -80°C até seu uso.

3.2.2.3 Preparo de suspensões de eritrócitos de ovelhas e coelhos

De modo a analisar a ativação das vias Clássica e Alternativa, foram adquiridas comercialmente amostras de glóbulos vermelhos de ovelha (via Clássica) e de coelho (via Alternativa) (Kalifarma, Brasil). Ambos os eritrócitos foram centrifugados e o sobrenadante removido. Os glóbulos vermelhos foram lavados três vezes com soro fisiológico (0,9% NaCl). Os eritrócitos de ovelha (SE) também foram lavados uma vez com HBC e eritrócitos de coelho (RE) com HBA. Após a última centrifugação, o SE foi

separado e ressuspenso em tampão HBC (2,4% v/v, suspensão celular). O SE foi sensibilizado com volume igual de hemolisina (soro de coelho anti-hemácia de carneiro, concentração 1: 2000, Kalifarma) por 30 min a 37°C. Assim, suspensões de SE (1,2% v/v) e RE (2,4% v/v) foram utilizadas para os ensaios hemolíticos Clássico e Alternativo, respectivamente.

3.2.2.4 Ensaios Hemolíticos das Vias Clássica e Alternativa

Para os ensaios hemolíticos, 20 µL das diferentes diluições de cada extrato (E1 e E2) foram incubados com 50 µL de NHS (equivalente a 50% de hemólise) e 50 µL de SE ou RE sensibilizado para ensaios de vias Clássica e Alternativa, respectivamente, por 30 min a 37°C. Além disso, os seguintes controles foram incluídos nos ensaios de hemólise clássica e alternativa:

(a) 70µL de água ultra pura e 50 µL de SE ou RE previamente sensibilizados, correspondendo a 100% de hemólise.

(b) 20 µL de HBC ou HBA, 50 µL de NHS e 50 µL de SE ou RE, correspondentes a 0% hemólise.

(c) 20 µL de HBC ou HBA, 50 µL de NHS e 50 µL de SE ou RE, correspondendo a 50% de hemólise.

As amostras e controles foram centrifugados (Centrifuge 5430, Eppendorf), e o sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo plano contendo 96 poços. A absorbância foi lida a 405 nm em espectrofotômetro (Biotek Instruments ELx800). Todos os extratos foram previamente testados quanto à atividade hemolítica nas mesmas concentrações utilizadas em todos os experimentos, nenhum deles apresentou hemólise detectável, sendo ambos considerados não hemolíticos. Todos os experimentos foram executados duas vezes em triplicata. Os resultados foram expressos como a porcentagem de hemólise obtida em comparação com amostras de controle adaptadas de Alban et al. (2002).

3.2.3 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média com desvio padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) com comparação múltipla de Bonferroni como pós-teste (** $p < 0,001$, ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$) e o IC_{50} foi calculado usando o software GraphPad Prism 5.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

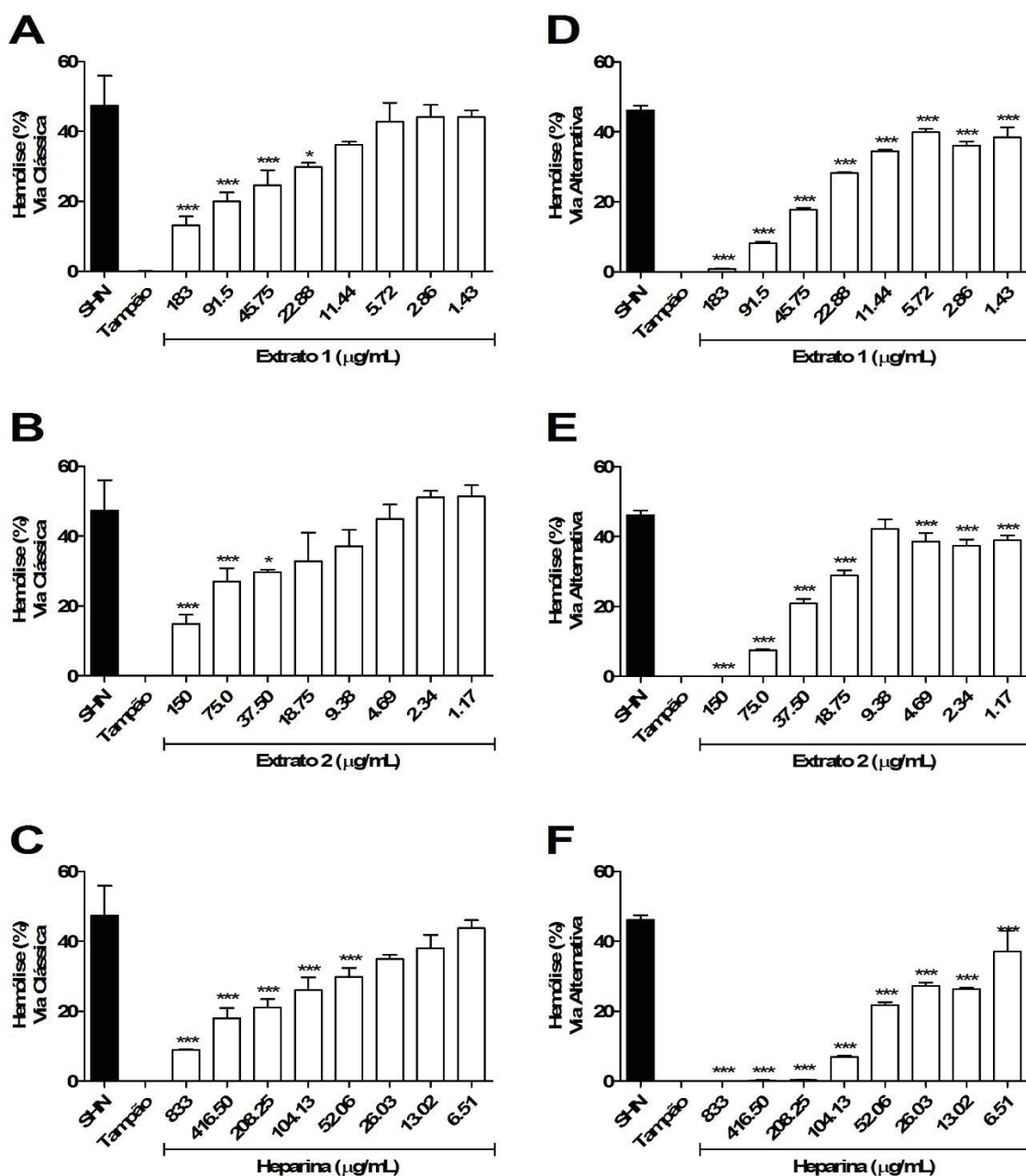
Os extratos E1 e E2 de *A. lappa* apresentaram efeito inibitório sobre a ativação de ambas as vias, Clássica e Alternativa, quando comparados ao controle positivo NHS, como mostrado na FIGURA 11.

O extrato E1 (concentração $183 \mu\text{g mL}^{-1}$) inibiu 43,3% e 49,6% de hemólise pelas vias clássica e alternativa, respectivamente. Por outro lado, o extrato E2 (na concentração $150 \mu\text{g mL}^{-1}$) inibiu 42,5% e 49,9% da hemólise pelas vias clássica e alternativa, respectivamente. O efeito inibitório de ambos os extratos foi comparado com o controle positivo de 50% da hemólise. Um efeito inibitório foi observado para E1 e E2 na via clássica em concentrações de $22,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $37,50 \mu\text{g mL}^{-1}$. O efeito inibitório na via alternativa foi observado mesmo em concentrações mais baixas de $1,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ para E1 e $1,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ para E2.

Além disso, o IC_{50} do extrato E1 foi de $28,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ e do extrato E2 foi de $20,12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o IC_{50} da heparina foi de $92,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ na ativação da via clássica. Da mesma forma, o IC_{50} do extrato E1 foi de $26,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o extrato E2 foi $27,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para a heparina foi de $27,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ na ativação da via alternativa.

Estes resultados indicam que os extratos supercríticos das folhas de *A. lappa* são capazes de inibir a ativação do complemento pelas vias clássica e alternativa, utilizando ensaios funcionais. Além disso, esse efeito inibitório foi observado em diferentes concentrações dos extratos E1 e E2 de *A. lappa*, mostrando um efeito inibitório dose-dependente para ambos os extratos.

FIGURA 11 - SUPRESSÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO PELOS EXTRATOS SUPERCRTÍCOS DE *Arctium lappa*: (A), (B) e (C) REPRESENTAM A ATIVAÇÃO DA VIA CLÁSSICA (D), (E) e (F) REPRESENTAM A ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA.



A concentração final dos dois extratos avaliados e o controle da heparina são representados no eixo x. Todas as diluições dos extratos foram comparadas com o controle positivo (SHN diluído para representar 50% da hemólise) por ANOVA e a comparação múltipla de Bonferroni como pós-teste (***) $p < 0,001$ e * $p < 0,05$). O controle negativo (tampão) representa 0% de hemólise. Além disso, diluições de heparina (Fig. C e F) foram usadas como controle do efeito inibitório na ativação do complemento. FONTE: A autora (2019).

Vale ressaltar que a via alternativa corresponde a 80-90% da ativação total do sistema complemento (HARBOE; MOLLNES, 2008), e que o efeito dos extratos de *A. lappa* nessa via foi expressivo. Embora várias propriedades biológicas de *A. lappa* já tenham sido descritas (CHAN et al., 2011), este estudo é o primeiro a descrever sua ação como inibidora/reguladora do sistema complemento. Essa atividade imunomoduladora corrobora com a atividade antiinflamatória anteriormente relatada, como ativação de enzimas antioxidantes e eliminação de radicais livres (LIN et al., 1996), supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias (WU et al., 2014; ZHAO; WANG; LIU, 2009).

Considerando os resultados semelhantes para os extratos E1 e E2 nos ensaios de ativação do complemento, verificou-se que as condições de pressão utilizadas (15 e 25 MPa) para obtenção destes extratos não parecem ter afetado as propriedades inibitórias dos compostos extraídos. Os compostos predominantes com atividade biológica compartilhada pelo extrato E1 e E2 foram os triterpenóides acetato de lupeol e acetato de amirina, além do diterpeno fitol. Estes componentes já foram descritos como substâncias anti-inflamatórias (MILANI et al., 2019; PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2018; TATIYA et al., 2017; WANG et al., 2016).

Um dos mecanismos anti-inflamatórios do acetato de lupeol em modelos de artrite foi a supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e a inibição da osteoclastogênese (WANG et al., 2016). Além disso, acetato de lupeol e acetato de amirina, detectados como componentes principais em extratos de folhas de *Cnidocolus chayamansa*, apresentaram atividade hepatoprotetora e anti-inflamatória em modelos crônicos de dano hepático (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Acetato de amirina isolado de *Alstonia boonei* apresentou inibição significativa de edemas de animais, e também reduziu a migração total de leucócitos e a infiltração de neutrófilos em testes *in vivo*, indicando a ação anti-inflamatória (OKOYE et al., 2014). Os resultados deste estudo corroboram com os achados por Jin et al. (2007) que descobriram que o acetato de amirina isolado das folhas e galhos de *Acer okamotoanum* exibia um efeito inibitório significativo na ativação da via clássica.

O diterpeno fitol foi identificado como o composto mais abundante de óleo essencial obtido das folhas de *Cleome rutidosperma* (popularmente chamada de flor de aranha), e exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (MCNEIL et al., 2018), e também mostrou diminuir a resposta auto-imune tanto na fase aguda quanto na fase crônica de artrite (HULTQVIST et al., 2006).

É importante considerar que a composição dos extratos pode ser influenciada pelas condições do processo de extração. Alguns compostos são mais sensíveis do que outros e, dependendo do tempo de exposição a altas temperaturas ou pressões, podem ser degradados. Isso pode justificar a falta do composto arctigenina nos extratos obtidos neste estudo, um composto já identificado em frações de *A. lappa* (GAO; YANG; ZUO, 2018; WANG et al., 2017) com importante papel anti-inflamatório (WU et al., 2014; ZHAO; WANG; LIU, 2009). No entanto, a atividade anti-inflamatória observada com os extratos E1 e E2 pode ser devida aos demais componentes detectados: amirina, lupeol e fitol (OKOYE et al., 2014; SALEEM, 2009; SILVA et al., 2013b; TYAGI; AGARWAL, 2016).

O presente estudo também demonstrou que a extração supercrítica usando CO₂ como solvente resulta em extratos com importantes atividades biológicas, como observado na ativação do complemento. Além disso, o número de estudos sobre compostos vegetais obtidos por extração supercrítica aumentaram significativamente nos últimos anos, principalmente devido à sua alta aplicabilidade em saúde, fitoterápicos, cosméticos e alimentos nutracêuticos (MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014).

A extração supercrítica é um campo de interesse para a indústria farmacêutica para explorar novas espécies de plantas com potencial uso medicinal (BASER; BUCHBAUER, 2010). Assim, embora exista uma alta demanda pela substituição de substâncias sintéticas por recursos naturais, a sustentabilidade é baseada na abundância e disponibilidade de matérias-primas. Como perspectivas futuras, os efeitos dos extratos de folhas de *A. lappa* sobre a ativação da via da lectina também devem ser considerados.

3.4 CONCLUSÃO

Extratos de de folhas de *A. lappa* são investigados devido às suas atividades biológicas. Neste trabalho, demonstrou-se pela primeira vez que estes extratos, obtidos por extração supercrítica usando CO₂ como solvente e etanol como co-solvente apresentaram uma boa inibição na ativação do sistema complemento tanto pela via Clássica quanto pela via Alternativa. Além disso, o efeito inibitório dos extratos de *A. lappa* na ativação do complemento não foi afetado pelas diferentes pressões

utilizadas no processo de extração. Assim, os dados demonstram uma potencial função anti-inflamatória dos extratos de *A. lappa* destacando sua aplicação como alternativa promissora no tratamento de doenças inflamatórias associadas à ativação do complemento.

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Arctium lappa* OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO E CO₂ SUPERCRÍTICO

O conteúdo deste capítulo foi publicado na revista *The Journal of Supercritical Fluids*
DOI 10.1016/j.supflu.2019.104573

RESUMO

Extração com líquido pressurizado (PLE) de folhas de *Arctium lappa* utilizando solução hidroalcoólica foi investigada e apresentada pela primeira vez neste trabalho. Além disso, o rendimento de extração, a composição química, compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de PLE foram comparados com aqueles obtidos por extração com fluido supercrítico (SFE). As extrações do tipo PLE foram avaliadas em diferentes condições de pressão (15, 20 e 25) MPa e temperatura (40, 60 e 80 °C). O maior rendimento de extração (37,40%) foi obtido por PLE a 15 MPa e 80 °C. Além disso, este mesmo extrato apresentou as maiores concentrações dos compostos fenólicos ácido clorogênico (1,84%) e rutina (1,46%) e exibiram considerável atividade de eliminação de radicais livres de DPPH (160,54 $\mu\text{mol}_{\text{Trolox}} \text{g}^{-1}$). O extrato ótimo de PLE exibiu concentrações consideráveis de fitol, lupeol e amirina, tornando esta uma alternativa promissora para a obtenção de extratos biologicamente ativos de fontes naturais, como folhas de *Arctium lappa*.

Palavras-chave: Folhas de *Arctium lappa*, extração supercrítica, extração com líquido pressurizado, atividade antioxidante, compostos fenólicos.

4.1 INTRODUÇÃO

Devido à constante demanda das indústrias alimentícia e farmacêutica por novas fontes naturais ricas em aplicações nutricionais e nutracêuticas, os pesquisadores têm investigado as melhores maneiras de extrair compostos bioativos de matérias-primas vegetais. Um exemplo dessas matérias-primas, é a planta medicinal *Arctium lappa*, comumente conhecida como bardana, considerada neste estudo. *A. lappa* é uma

planta nativa da Europa e da Ásia, e rapidamente espalhou-se pelo Brasil, onde cresce espontaneamente em campos, florestas e áreas rurais. Sua aclimação é tão fácil e rápida que esta planta é considerada uma espécie invasora (BOON; SMITH, 2009; LORENZI; MATOS, 2002).

Diferentes partes da planta de bardana possuem propriedades biológicas como antioxidante (CLAUDIU et al., 2018; JIANG et al., 2019; LIU et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2018; SOUZA et al., 2018), antibacterianas (CLAUDIU et al., 2018; LOU et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA et al., 2018) e atividades anti-inflamatórias (ALMEIDA et al., 2013; CLAUDIU et al., 2018; WU et al., 2014). Por isso, seu estudo é oportuno e viável, além de levar em consideração a facilidade e o baixo custo de seu cultivo. Ainda hoje, a bardana é pouco utilizada e há poucos estudos publicados dedicados à obtenção, caracterização e aplicação de seus valiosos extratos.

Compostos bioativos de *Arctium lappa* podem ser obtidos a partir de diferentes métodos de extração, por exemplo métodos de baixa pressão, como Soxhlet, ultrassom e extração por microondas (JIANG et al., 2019; LOU et al., 2012; ZHAO et al., 2014). No entanto, o foco atualmente é nos processos de extração que utilizam menores quantidades de solventes, apresentam altos rendimentos de extração e pouco impacto ambiental. Em vista disso, estudos anteriores examinaram o potencial de um “solvente verde” - dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) - para obter extratos biologicamente ativos de *A. lappa* (RODRIGUEZ et al., 2018; SOUZA et al., 2018) e a adição de etanol como co-solvente para alterar a natureza não-polar da mistura de solventes, aumentando a extração de compostos polares (BABOVA et al., 2016; GUEDES et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2018; SHARIF et al., 2015; SOUZA et al., 2018).

Outra técnica de extração que surgiu como uma alternativa as técnicas convencionais é a extração líquida pressurizada (PLE – Pressurized Liquid extraction). O método PLE submete solventes líquidos a condições de altas pressões e temperaturas, normalmente acima da temperatura de ebulição. Isso favorece o desempenho da extração porque o solvente permanece no estado líquido mesmo a temperaturas acima do seu ponto de ebulição (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Altas temperaturas melhoram as taxas de transferência de massa, favorecendo a extração de solutos da matéria-prima para o solvente. Além disso, elevando a temperatura aumenta-se a solubilidade e difusividade dos compostos, enquanto a tensão superficial e viscosidade do solvente são reduzidos. A alta pressão também

favorece a extração, pois difunde o solvente na estrutura da matriz de matéria-prima, aumentando assim o contato do solvente com os compostos de interesse (GONÇALVES et al., 2016; MUSTAFA; TURNER, 2011; RAMOS; KRISTENSON; BRINKMAN, 2002).

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi duplo: i) comparar as capacidades de obter extratos de folhas de *Arctium lappa*, em termos de rendimento global de extração, de duas técnicas de extração, PLE e SFE e ii) comparar a qualidade dos extratos obtidos em termos de atividade antioxidante, composição química e conteúdo fenólico total. Os resultados indicam qual das duas técnicas tem melhor desempenho em termos de obtenção de extratos ricos em compostos biologicamente ativos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Preparo e caracterização da matéria-prima

A matéria-prima (*Arctium lappa*) utilizada neste trabalho foi a mesma utilizada anteriormente por Souza et al. (2018), coletadas em Ivaiporã (PR-Brasil). As partes aéreas das plantas foram colhidas, higienizadas e secas em estufa de circulação de ar a 50 ± 2 °C por 24 h. Na sequência o material foi moído e granulometricamente separado por peneiras da serie de Tyler. O diâmetro médio das partículas e a caracterização da matéria-prima estão detalhadamente apresentadas em estudo anterior (SOUZA et al., 2018).

4.2.2 Métodos de extração

4.2.2.1 Extração sequencial com fluido supercrítico (SE)

Os experimentos foram realizados em uma unidade de extração supercrítica em escala de bancada. O equipamento e os procedimentos aplicados neste estudo foram descritos em detalhes por outros autores (FETZER et al., 2018; MESOMO et al., 2012, 2013; RODRIGUEZ et al., 2018; SOUZA et al., 2018). Como mostrado anteriormente (SOUZA et al., 2018), a extração de folhas de *A. lappa* com scCO₂, usando etanol

como co-solvente, apresentou bons resultados para obtenção de extratos biologicamente ativos. Assim, neste estudo, o scCO₂ com etanol (scCO₂ + EtOH) foi aplicado novamente, mas em uma extração sequencial dividida em etapas. O objetivo deste método sequencial foi investigar qual das duas aplicações tem melhor desempenho em relação ao rendimento e extratos bem como em suas composições. Seis etapas de extrações sequenciais foram realizadas visando a garantia de recuperação completa do material extraível.

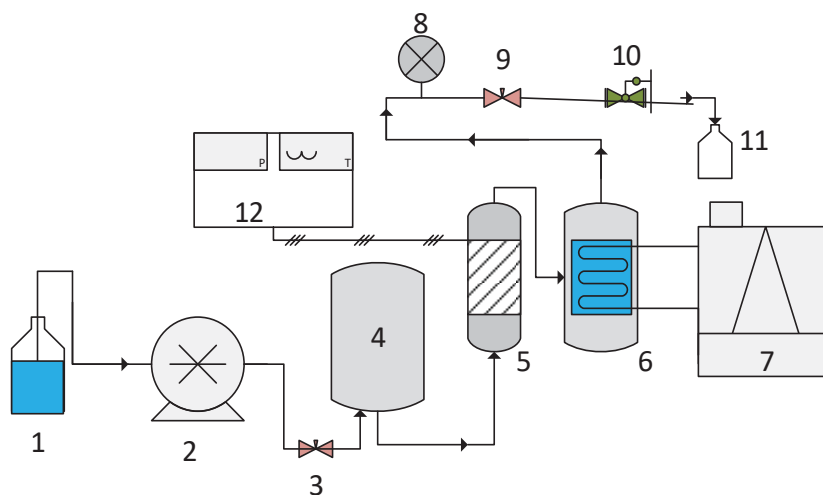
A extração foi realizada sob as condições ótimas de operação identificadas anteriormente (15 MPa e 80°C) (SOUZA et al., 2018), e nestas mesmas condições a mesma amostra (o resíduo da etapa anterior) foi submetido a outra extração com uma nova mistura de solventes (scCO₂ e etanol). Para todas as etapas, o procedimento experimental utilizado foi semelhante ao descrito em detalhes por Souza et al. (2018). Resumidamente, cerca de $20 \pm 0,2$ g da matéria-prima foram embebidos com etanol numa proporção de massa de 2:1 (massa etanol: massa de matéria-prima) e carregada no extrator. Em seguida, o extrator foi carregado com CO₂. A pressão e a temperatura foram ajustadas e o período de extração estática (tempo de confinamento) foi fixado em 60 minutos. Decorrido este tempo, deu-se início a extração dinâmica, utilizando o solvente CO₂ comprimido. Além disso, para examinar a influência do uso de co-solventes na eficiência da SE, água destilada foi adicionada ao etanol como solvente auxiliar (aqui referido como procedimento scCO₂+EtOH_{H2O}). Para isso, uma solução hidroalcoólica contendo água em etanol na proporção mássica de 2:8 (fração mássica de água de 24%), foi preparada. O procedimento experimental de extração para este caso seguiu mesmo descrito acima.

4.2.2.2 Extração líquido pressurizado (PLE)

Os experimentos foram realizados em uma unidade de líquido pressurizado em escala de bancada. O sistema experimental (FIGURA 12) consistiu em um reservatório para o solvente, uma bomba de deslocamento positivo de alta pressão (Eldex, Série 2SM Optos), uma válvula de agulha (Parker, Série MVE) para bloqueio de fluxo, um recipiente de pré-aquecimento, uma célula de extração de aço inoxidável (volume interno $V = 1,8 \times 10^{-5}$ m³, comprimento $L = 0,16$ m, diâmetro $\Phi = 1,2 \times 10^{-2}$ m) com camisa de aquecimento para controle de temperatura, seguido por um recipiente

de resfriamento (*chiller*) acoplado a um banho ultratermostatizado (Solab, SL 152). Para controle de pressão no extrator, uma válvula agulha (Parker, Série MVE) e uma válvula de contrapressão (Swagelok, KPB Series) foram usadas. Todos os tubos e conexões eram de aço inoxidável (1/8"). A PLE foi realizada utilizando como solventes o etanol e também soluções hidroalcoólicas (misturas de água em etanol). Cerca de 7,5 g de matéria-prima foram utilizadas, criando assim um leito fixo dentro do extrator. O procedimento experimental começou pelo ajuste da temperatura da unidade extração. Depois que o sistema atingiu a temperatura desejada, abriu-se a válvula agulha de bloqueio para que o solvente, quando bombeado (taxa de fluxo 2,0 mL min⁻¹), alcançasse a célula de extração. Quando o solvente foi visualizado na saída do tubo, a válvula agulha de controle de pressão e a válvula de contrapressão foram fechadas, permitindo assim que o sistema atingisse a pressão desejada, esta pressão é constantemente controlada (usando a válvula de contrapressão) no *set point*.

FIGURA 12 - SISTEMA EXPERIMENTAL PLE: (1) RESERVATÓRIO; (2) BOMBA DE DESLOCAMENTO POSITIVO DE ALTA PRESSÃO; (3) VÁLVULA AGULHA DE BLOQUEIO DE FLUXO; (4) RECIPIENTE DE PRÉ-AQUECIMENTO; (5) CÉLULA DE EXTRAÇÃO COM CONTROLE DE TEMPERATURA; (6) RECIPIENTE DE REFRIGERAÇÃO; (7) BANHO ULTRATERMOSTATIZADO; (8) MANÔMETRO; (9) VÁLVULA AGULHA DE CONTROLE DE PRESSÃO; (10) VÁLVULA DE CONTRAPRESSÃO; (11) RECIPIENTE COLETOR DO EXTRATO FINAL; (12) SENSORES DE PRESSÃO E TEMPERATURA.



FONTE: A autora (2019)

No fim do tempo de extração estática (fixado em 10 min) quando o equilíbrio foi atingido, a válvula agulha foi aberta, a pressão foi novamente regulada pela válvula de contrapressão e a extração dinâmica foi iniciada. Testes preliminares com diferentes soluções hidroalcoólicas foram realizados, mostrando que, a fim de

recuperar compostos fenólicos totais e obter altos rendimentos de extração, uma solução hidroalcoólica contendo água em etanol na proporção mássica de 1:9 (fração mássica de água 12%) deve ser usada.

Além disso, a fim de avaliar a influência das variáveis temperatura e pressão nos resultados de rendimento da extração, os experimentos foram realizados a temperaturas de 40, 60 e 80°C e pressões de 15, 20 e 25 MPa, seguindo um planejamento experimental com triplicata no ponto central. A temperatura máxima foi fixada em 80°C a fim de evitar a decomposição dos compostos sensíveis ao calor presentes nos extratos. A fração mássica de água na solução hidroalcoólica foi fixada em 12%. O fluxo de solvente foi de $1,2 \pm 0,15 \text{ mL min}^{-1}$. O tempo total de extração foi fixado em 240 min, definido por testes preliminares. Os extratos foram coletados em frascos de vidro, armazenados no escuro e sob baixa temperatura ($-5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) até serem analisados.

4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS)

As análises de cromatografia foram realizadas no departamento de química, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para esta análise, os extratos foram dissolvidos (1 mg mL^{-1}) em diclorometano (grau espectroscópico, 99,9% de pureza, Sigma-Aldrich). O equipamento utilizado foi o GC-MS (Shimadzu TQ8040), constituído por uma coluna capilar não polarizada HP-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, espessura de $0,25 \text{ }\mu\text{m}$, 5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano). O procedimento experimental aplicado foi semelhante ao descrito por Souza et al. (2018). A identificação de compostos baseou-se no banco de dados da biblioteca NIST-14 e na comparação com dados disponíveis na literatura.

4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.4.1 Conteúdo fenólico total (TPC)

O conteúdo fenólico total (TPC - total phenolic content) foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (ROSSI JR; SINGLETON, 1965), usando ácido gálico como padrão, como apresentado anteriormente (SOUZA et al., 2018). O

procedimento consistiu na mistura de 0,1 mL de extrato ($6 \text{ mg mL}_{\text{etanol}}^{-1}$), 7,9 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio a 20%, em frascos volumétricos. A mistura reacional foi mantida no escuro durante 2 h e, em seguida, a absorvância foi medida a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico (GAE) por grama do extrato ($\text{mg}_{\text{GAE}} / \text{g}_{\text{extrato}}$).

4.2.4.2 Ensaio DPPH

A avaliação antioxidante pelo método DPPH foi realizado utilizando o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazílico (DPPH), seguindo Souza et al. (2018) onde o procedimento foi adaptado de Mensor et al. (MENSOR et al., 2001). Os resultados foram expressos como a metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}), onde IC_{50} é a concentração (mg mL^{-1}) de extrato necessária para inibir a produção de radicais em 50%. Os resultados também foram expressos em μmol equivalente trolox g^{-1} .

4.2.4.3 Ensaio FRAP

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Barbi et al. (2018), de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram expressos em μmol equivalente trolox g^{-1} .

4.2.4.4 Ensaio ABTS

O método de Re et al. (1999) foi usado para determinar a atividade de sequestro do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de acordo com o procedimento descrito por Barbi et al. (2018). Os resultados foram expressos em μmol equivalente trolox g^{-1} .

4.2.5 Identificação dos compostos fenólicos

Um método de HPLC de fase reversa foi empregado para determinar as concentrações de ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico), ácido protocatecuico

(ácido 3,4-di-hidroxibenzóico), ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico) e hidrato de rutina (quercetina-3-rutinosídeo hidrato) nos extratos das folhas de *A. lappa*. As amostras foram solubilizadas com acetonitrila (Panreac - grau HPLC) e eluente A (fase móvel descrita na sequência), e analisadas pelo sistema de HPLC Agilent 1200 Series (Wilmington, DE, EUA), equipado com um detector de arranjo de diodo (DAD) comandado pelo Software EZChrom Elite (Agilent), um amostrador automático de líquidos (ALS) e bomba quaternária. Os compostos foram separados por coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm) (Agilent). O volume de injeção foi de 15 µL. A fase móvel consistia em água (ultrapura), ácido fórmico (Vetec 80% v/v) e acetonitrila (95:2:3, v/v/v - eluente A) e água/ácido fórmico/acetonitrila (48:2:50, v/v/v - eluente B). As análises foram realizadas utilizando um gradiente com os eluentes A e B, programados da seguinte maneira: a corrida partiu de 88% A e mudou para 85% A (6 min), para 60% A (16 min), para 53% A (20 min), para 15% A (24 min), mantida por até 31 min e retornou a 88% A (32 min) até o final da corrida (35 min). A taxa de fluxo foi constante em 0,9 mL min⁻¹. Os cromatogramas foram registrados em 280 nm para determinação do ácido gálico e do ácido 3,4-di-hidroxibenzóico. O ácido clorogênico e rutina foram determinadas a 320 e 370 nm, respectivamente. A concentração de compostos foi determinada por calibração externa usando padrões (pureza > 99%) comprados da Sigma-Aldrich. A identificação dos compostos foi realizada com base no tempo de retenção e espectro de absorção de UV dos padrões. Todos os resultados foram analisados estatisticamente usando Statistica 7.0® (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Extração com fluido supercrítico

As características da matéria-prima utilizada neste estudo foram dadas em trabalho anterior (SOUZA et al., 2018). As folhas secas de *A. lappa* possuíam umidade residual de aproximadamente 5,97 ± 0,02% e diâmetro de partícula, definido pela série Tyler, de (1,3 ± 0,4) × 10⁻³ m.

Para as SE (extrações sequenciais utilizando scCO₂+EtOH), a mesma amostra foi usada para todas as seis etapas, enquanto na scCO₂+EtOH_{H2O} foi utilizada uma

matéria-prima nova. Todas as extrações foram realizadas a 15 MPa, 80°C e com razão mássica entre etanol e matéria-prima de 2:1 (massa de etanol: massa de sólidos). A atividade antioxidante foi avaliada para verificar as variações das atividades biológicas nos extratos obtidos. Os rendimentos de extração obtidos pela aplicação de scCO₂+EtOH em etapas consecutivas, assim como o rendimento obtido pela aplicação de scCO₂+EtOH_{H2O} são apresentados na Tabela 8, onde os resultados para a atividade antioxidante (método DPPH) e o conteúdo de fenólicos totais (TPC) são apresentados também.

TABELA 8 - RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELO MÉTODO DPPH PARA EXTRATOS DE FOLHAS DE *A. lappa* OBTIDOS A 15 MPa E 80°C USANDO scCO₂+EtOH EM EXTRAÇÃO SEQUENCIAL (SE) E COM ADIÇÃO DE ÁGUA (scCO₂+EtOH_{H2O}).

Exp.	Extração	Tempo de extração (min)	Rendimento Individual (%)	Rendimento Total (%)	TPC (mg _{GAE} g _{extract} ⁻¹) [#]	IC ₅₀ (mg _{extract} mL ⁻¹) [#]
1	scCO ₂ -SE step 1	25	6,10 ± 0,22	6,10 ± 0,22	44,57 ^{ab} ± 0,8	0,40 ^a ± 0,03
2	scCO ₂ -SE step 2	50	2,79 ± 0,17	8,89 ± 0,06	42,93 ^{ab} ± 3,91	0,24 ^b ± 0,01
3	scCO ₂ -SE step 3	75	1,75 ± 0,55	10,65 ± 0,50	47,62 ^a ± 0,91	0,21 ^b ± 0,03
4	scCO ₂ -SE step 4	100	0,88 ± 0,07	11,53 ± 0,43	39,21 ^b ± 2,77	e.i.
5	scCO ₂ -SE step 5	125	0,74 ± 0,07	12,27 ± 0,35	e.i.	e.i.
6	scCO ₂ -SE step 6	150	0,50 ± 0,12	12,78 ± 0,47	e.i.	e.i.
7	scCO ₂ +EtOH _{H2O}	25	9,12	9,12	72,32 ± 3,17	0,70 ± 0,03

e.i.- extrato insuficiente

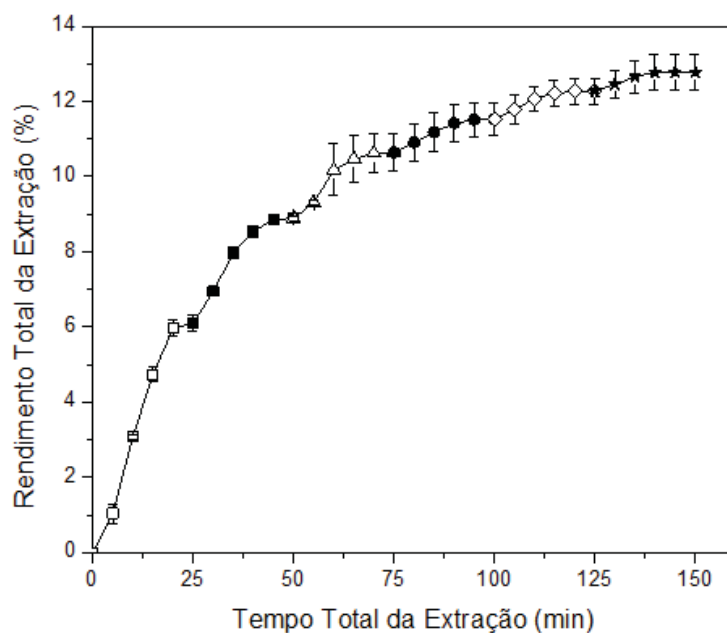
[#]Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (p <0,05)

FONTE: A autora (2019)

Na FIGURA 13 estão apresentadas as curvas cinéticas de extração, onde o rendimento total no final da sexta (150 minutos) da extração sequencial, atingiu 12,8% (Experimento 6, Tabela 8), enquanto em uma única etapa, após 25 minutos de extração, o rendimento foi de cerca de 6% (Experimento 1, Tabela 8). Na extração sequencial (Experimentos, 1-6), o conteúdo fenólico total nos extratos não foi significativamente alterado e a atividade antioxidante verificada pelo método DPPH mostrou uma diminuição no valor de IC₅₀ da primeira para a terceira etapa, indicando uma pequena melhora dessa propriedade. Apesar de na SE obter-se um maior rendimento de extratos com boas propriedades biológicas, o volume de solvente volume utilizado foi muito grande, aproximadamente cinco vezes maior do que o

volume gasto em uma única etapa. Deste ponto de vista, a aplicação do método de extração sequencial pode não apresentar grandes vantagens sobre a extração de etapa única para essa matéria-prima.

FIGURA 13 - CURVAS DE EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM SEIS ETAPAS UTILIZANDO ETANOL COMO CO-SOLVENTE A 15 MPa E 80°C: (□) ETAPA 1; (■) ETAPA 2; (Δ) ETAPA 3; (●) ETAPA 4; (◇) ETAPA 5; (★) ETAPA 6.



FONTE: A autora (2019)

No entanto, verificou-se que, para o procedimento de etapa única com solução hidroalcolica como co-solvente ($\text{scCO}_2 + \text{EtOH}_{\text{H}_2\text{O}}$), foi possível obter um rendimento de aproximadamente 9% em apenas 25 minutos de extração (Experimento 7, Tabela 8), representando um aumento de cerca de 3% em relação ao rendimento obtido para a mesma extração utilizando apenas etanol como co-solvente. Alcançar uma boa eficiência em pouco tempo é muito importante do ponto de vista de economia de energia (VEGGI et al., 2014). O mesmo fenômeno foi observado por Solana et al. (2014) e Paes et al. (2014), ou seja, os resultados de maior rendimento para scCO_2 foram obtidos quando a água foi inserida no sistema com o co-solvente. Além dos bons rendimentos de extração, o extrato obtido apresentou alta concentração de compostos fenólicos ($72,32 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{extract}}^{-1}$) quando comparados com os outros, provavelmente devido natureza hidrofílica destes constituintes, como o hidrato de rutina (DUFFUS et al., 2016).

4.3.2 Extração com líquido pressurizado

Entre os métodos de extração, o PLE tem se destacado devido ao uso de menores quantidades de solvente (GARCIA-MENDOZA et al., 2017; PEREIRA et al., 2019). Neste estudo, o PLE foi utilizado como uma técnica alternativa para obtenção de extratos de folhas de *A. lappa* com propriedades biológicas favoráveis. Testes preliminares revelaram que as melhores condições de extração foram a 80°C e 15 MPa. Na Tabela 9 estão apresentados os dados de rendimento global, conteúdo fenólico e atividade antioxidante dos extratos obtidos por PLE realizadas com diferentes concentrações de soluções hidroalcoólicas como solvente.

Inicialmente, no intuito de comparar a eficiência do PLE com a extração de Soxhlet realizada utilizando água pura como solvente, as extrações foram realizadas com diferentes frações mássicas de água na solução hidroalcoólica (12, 24, 55%).

TABELA 9 - RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO, CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH) DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *A. lappa* OBTIDOS POR PLE REALIZADAS A 15 MPa E 80°C, UTILIZANDO SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA COM DIFERENTES FRAÇÕES MÁSSICAS DE ÁGUA.

Experimento	Fração mássica de água (%)	Rendimento da extração (%)	TPC (mg _{GAE} g _{extract} ⁻¹) [#]	IC ₅₀ (mg _{extract} mL ⁻¹) [#]
1	0	13,50	42,04 ^c ± 1,15	0,28 ^c ± 0,005
2	12	37,40	55,38 ^b ± 2,18	0,20 ^d ± 0,006
3	24	38,73	37,45 ^c ± 1,03	0,28 ^c ± 0,005
4	55	40,35	69,03 ^a ± 2,98	0,38 ^b ± 0,020
5*	100	33,58	81,55 ^d ± 6,60	0,67 ^a ± 0,002

*Extração Soxhlet com solvente água.

[#]Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (p <0,05).

FONTE: A autora (2019).

Embora tenha sido possível verificar que a adição de água promoveu um aumento no rendimento de extração (Experimento 1 e 2), não houve aumento significativo observado em relação ao uso de diferentes concentrações hidroalcoólicas (Experimento 2-4). Em um estudo anterior, Souza et al. (2018) mostraram que a capacidade de extração das folhas de *A. lappa* é melhorada na presença de um solvente polar, indicando que os constituintes desta matéria-prima são principalmente compostos polares. Portanto, a adição de água como parte do solvente utilizado em PLE resultou na obtenção de um rendimento máximo de extração (OTERO; LÓPEZ-MARTÍNEZ; GARCÍA-RISCO, 2019). Os valores de TPC também foram melhorados

na presença de água porque, geralmente, aumenta-se a extração de compostos fenólicos (PEREIRA et al., 2019).

Por um lado, enquanto a adição de água melhorou tanto o rendimento de extração quanto os valores de TPC, as respostas para atividade antioxidante diminuíram. Portanto, a fração mássica de água na solução hidroalcoólica foi fixada em 12% e um planejamento experimental 2² foi realizado para determinar a influência das variáveis temperatura e pressão.

As diferentes condições experimentais aplicadas para obtenção de extratos de *A. lappa* por PLE utilizando solução hidroalcoólica é apresentada na Tabela 10, onde também se apresentam os resultados referentes ao rendimento de extração, conteúdo fenólico total e atividade antioxidante.

Na Tabela 10 verifica-se que todos os valores de rendimento de extração são maiores aos valores obtidos por SE (Tabela 8). Nota-se que nas extrações realizadas a uma temperatura fixa (Experimentos 1-2 e 3-4, respectivamente), o rendimento de extração diminuiu com o aumento da pressão, como mostrado na FIGURA 14 (a-b). No entanto, a uma pressão fixa, com o aumento da temperatura (Experimentos 1-3 e 2-4, respectivamente) aumentou-se o rendimento de extração, como mostrado na FIGURA 14 (c-d).

TABELA 10 - RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO, CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH) PARA EXTRATOS OBTIDOS POR PLE DE FOLHAS DE *A. lappa* SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E PRESSÕES UTILIZANDO SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA (FRAÇÃO MÁSSICA DE ÁGUA FIXA EM 12%) COM SOLVENTE.

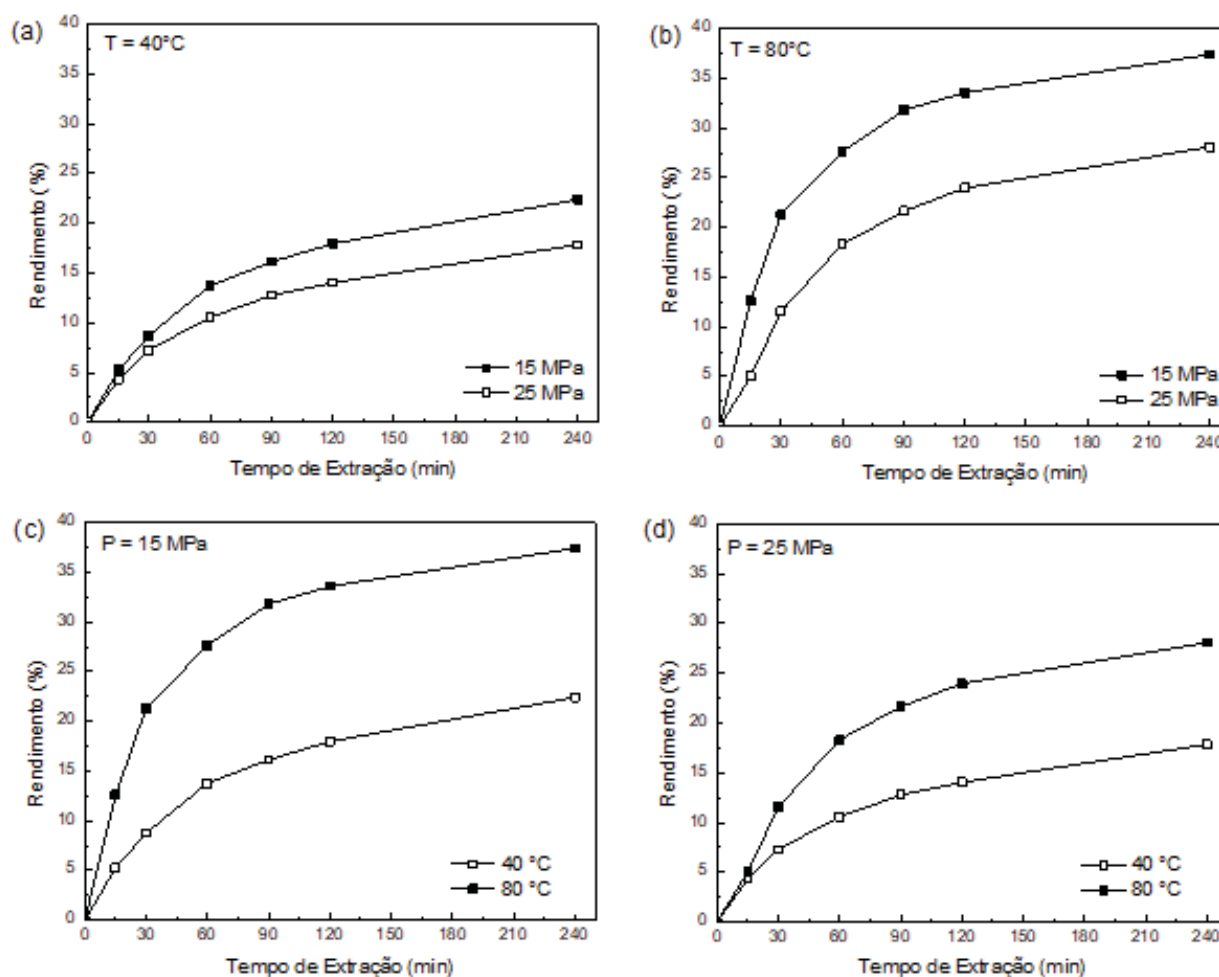
Experimento	P (MPa)	T (°C)	Tempo de Extração (min)	Rendimento da Extração (%)	TPC (mg _{GAE} g _{extract} ⁻¹)	IC ₅₀ (mg _{extract} mL ⁻¹)
1	15	40	240	22,41	13,14 ^d ± 0,38	0,63 ^a ± 0,10
2	25	40	240	17,86	23,28 ^c ± 0,5	0,46 ^c ± 0,004
3	15	80	240	37,40	55,38 ^a ± 2,18	0,20 ^e ± 0,006
4	25	80	240	28,10	41,64 ^b ± 2,06	0,25 ^d ± 0,009
5*	20	60	240	26,61±1,42	14,46 ^d ± 3,41	0,53 ^b ± 0,03

*Ponto central do planejamento experimental 2²

#Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey (p <0,05).

FONTE: A autora (2019).

FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA E PRESSÃO NO RENDIMENTO PLE EM QUALQUER TEMPERATURA FIXA EM (A) 40°C E (B) 80°C, OU PRESSÃO FIXA EM (C) 15MPa E (D) 25 MPa.

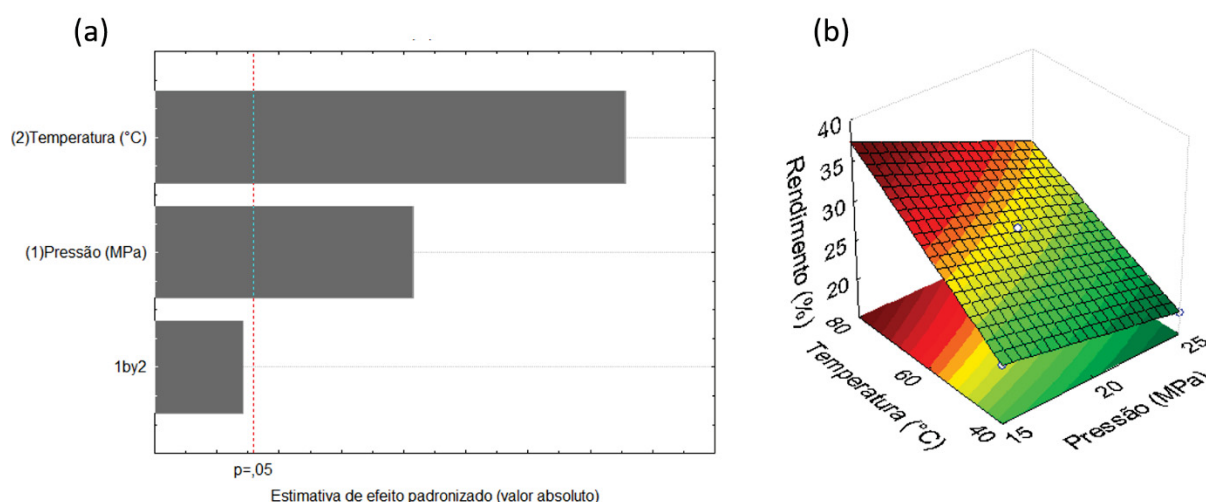


FONTE: A autora (2019)

Estatisticamente, o processo PLE foi influenciado significativamente ($p < 0,05$) por ambas as variáveis, temperatura e pressão, como mostrado no gráfico de Pareto (FIGURA-15a), enquanto a FIGURA-15b mostra a superfície de resposta correspondente em termos de rendimento de extração.

O mais alto rendimento (37,4%) foi obtido a 15 MPa e 80°C (Experimento 3), extrato esse que exibiu o maior conteúdo fenólico ($55,38 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{extract}}^{-1}$) e menor IC_{50} ($0,20 \text{ mg}_{\text{extracto}} \text{ ml}^{-1}$), indicando uma maior capacidade antioxidante, se comparado aos demais extratos.

FIGURA 15 - (A) GRÁFICO DE PARETO PADRONIZADO PARA AS VARIÁVEIS DE RESPOSTA TEMPERATURA E PRESSÃO ESTUDADAS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E (B) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CORRESPONDENTE.



FONTE: A autora (2019)

4.3.3 Identificação dos compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante

Como os resultados do TPC indicaram, os extratos de folhas de *A. lappa* contêm alta concentração de compostos fenólicos, e destes, analogamente a Solana et al. (2014), rutina e alguns ácidos fenólicos foram identificados neste estudo. A Tabela 11 mostra que os compostos presentes em maiores quantidades, para todas as amostras avaliadas, foram ácido clorogênico e rutina, enquanto os ácidos di-hidroxibenzóicos estão presentes em concentrações mais baixas. Uma breve comparação entre as amostras mostra que as maiores concentrações de fenólicos são exibidas pelos extratos obtidos pelos procedimentos PLE e $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}_{\text{H}_2\text{O}}$ (Experimento 1-5 e Experimento 9, respectivamente). Como esperado, a presença de água influenciou positivamente a extração de compostos fenólicos pelas duas técnicas. Ainda, nos extratos obtidos por PLE, a concentração fenólica foi superior, com os melhores resultados para ácido clorogênico e rutina identificados nas amostras obtidas sob temperatura mais alta (80°C), e nas pressões de 15 MPa e 25 MPa (Experimento 3 e 4, respectivamente), o qual está de acordo com os resultados obtidos e apresentados para os valores de TPC (Tabela 10). Este fato reforça a observação feita anteriormente de que no processo PLE, a pressão não é um fator significativo, enquanto a temperatura tem influência significativa. O mesmo comportamento foi verificado em outros estudos, como descrito por Pereira et al. (2019) em avaliação de extratos de

bagaço de uvas, Garcia-Mendoza et al. (2017) para extratos de resíduos de juçara, e Manuel et al. (2018) para extratos de produtos cítricos. Possivelmente, isso se deve a um aumento na solubilidade e difusividade, a altas temperaturas, dos fenólicos no solvente misto (etanol + água), além da diminuição da viscosidade e outros fatores, que podem influenciar a eficiência de extração (KIM et al., 2009; MUSTAFA; TURNER, 2011).

A fim de verificar se o tipo de processo de extração pode influenciar as propriedades biológicas dos extratos obtidos, a capacidade antioxidante foi mensurada. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 11, onde está claramente demonstrado que os resultados antioxidantes tem relação direta com os compostos fenólicos, como também foi verificado por Ferrentino et al. (2018). Em geral, todos os extratos exibiram propriedades antioxidantes ativas. Para o PLE (Experimentos 1-5), o extrato obtido a baixa pressão e temperatura mais alta (15 MPa e 80°C, Experimento 3) exibiu os melhores resultados, considerando os três ensaios realizados (DPPH, ABTS e FRAP). Este extrato também apresentou as maiores concentrações de compostos fenólicos (principalmente ácido clorogênico e rutina), concordando com a observação de que esses compostos são os que apresentam melhor reação de interação com os três ensaios (KATALINIC et al., 2006; SHIBAMOTO; MOON, 2009).

No entanto, uma análise mais completa revela que para ambas as técnicas (PLE e SFE) os melhores resultados variaram de acordo com os diferentes ensaios antioxidantes utilizados.

Como discutido por Shibamoto e Moon (2009), variações nas propriedades antioxidantes obtidas pela aplicação de DPPH, ABTS e FRAP são observadas devido ao fato de que alguns dos compostos presentes nos extratos podem exibir os mesmos comprimentos de onda UV que os compostos reagentes utilizados nos ensaios espectrofotométricos, causando assim uma interferência nos resultados. Portanto, é recomendável a aplicação de diferentes métodos para investigar as atividades antioxidantes das amostras.

De modo geral, tendo em conta as concentrações de compostos fenólicos, bem como os resultados dos testes antioxidantes, é possível concluir que a amostra que apresentou as melhores respostas foi para o extrato obtido via PLE sob 15 MPa e 80°C (Experimento 3).

TABELA 11 - COMPOSTO FENÓLICO IDENTIFICADO E RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA OS EXTRATOS DE FOLHAS DE *A. lappa* OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: **PLE** COM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA (FRAÇÃO MÁSSICA DE ÁGUA 12%), **SE** EM DIFERENTES ETAPAS COM ETANOL COMO CO-SOLVENTE E **SFE** COM SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA (FRAÇÃO MÁSSICA DE ÁGUA DE 24%) COMO CO-SOLVENTE.

Exp	Extração	P (MPa)	T (°C)	Composto Fenólico (%)				Atividade Antioxidante			
				Ácido Gálico	Dihidroxibenzóico	Ácido clorogênico	Rutina	IC ₅₀ (mg _{extract} mL ⁻¹)	DPPH (μmolTrolox g ⁻¹)	FRAP (μmolTrolox g ⁻¹)	ABTS (μmolTrolox g ⁻¹)
1	PLE	15	40	0,1205	0,0596	1,1125	0,6423	0,63 ^a ± 0,10	102,55 ^e ± 1,78	63,95 ^{de} ± 1,16	165,20 ^e ± 0,85
2	PLE	25	40	0,0974	0,0533	0,9827	0,6341	0,46 ^c ± 0,04	115,14 ^d ± 2,06	48,61 ^f ± 1,09	170,92 ^{de} ± 0,28
3	PLE	15	80	0,0908	0,0716	1,8453	1,4656	0,19 ^e ± 0,06	160,54 ^a ± 3,07	66,51 ^d ± 2,08	202,30 ^b ± 3,00
4	PLE	25	80	0,1003	0,0610	1,3068	1,2868	0,25 ^d ± 0,09	115,31 ^d ± 2,39	45,83 ^f ± 0,54	151,47 ^f ± 1,76
5*	PLE	20	60	0,1142	0,0401	0,8726	0,8952	0,53 ^b ± 0,03	130,10 ^c ± 1,53	60,49 ^e ± 3,74	174,18 ^d ± 2,04
6	scCO ₂ -SE	15	60	0,0384	0,0227	0,2899	0,3549	0,40 ^a ± 0,03	104,59 ^e ± 0,51	86,29 ^c ± 3,01	191,34 ^c ± 1,13
	step 1										
7	scCO ₂ -SE	15	60	0,0709	0,0319	0,4597	0,6307	0,24 ^b ± 0,01	135,20 ^{bc} ± 1,76	110,33 ^b ± 0,83	170,42 ^{de} ± 1,72
	step 2										
8	scCO ₂ -SE	15	60	0,2542	0,0428	0,6344	0,9154	0,21 ^b ± 0,03	143,71 ^b ± 4,34	129,65 ^a ± 0,99	227,78 ^a ± 2,21
	step 3										
9	SFEscCO ₂ + EtOH _{H2O}	15	60	0,0488	0,0645	0,8765	0,8369	0,70 ^f ± 0,03	124,83 ^c ± 0,78	107,25 ^b ± 0,54	206,54 ^b ± 0,75

*Ponto central do planejamento experimental 2²

Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p <0,05)

FONTE: A autora (2019)

4.3.4 Composição química

Nos extratos de folhas de *A. lappa*, diferentes compostos foram identificados por análise de composição - por exemplo. terpenóides, fenol e ésteres. Suas composições relativas (%) são apresentadas na Tabela 12.

Para os extratos obtidos por PLE e SFE com scCO₂, o composto presente em maior concentração foi o lupeol (4-36%). Resultados análogos foram obtidos por Souza et al. (2018). O lupeol é um triterpeno naturalmente presente em algumas matrizes vegetais e ganhou atenção por conta de seus altos efeitos biológicos como potencial anti-inflamatório e anti-câncer (BHATTACHARYYA; SEKAR; MAJUMDER, 2017; GALLO; SARACHINE, 2009; RAUTH et al., 2016; SALEEM, 2009; SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2015). O 2,4-di-tert-butilfenol encontrado em algumas amostras também é de importância significativa, devido suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas benéficas (BELGHIT et al., 2016; KULANGARA et al., 2015; VISZWAPRIYA et al., 2016). As altas as concentrações de fitol e amirina determinadas, estão em completa analogia com os resultados obtido anteriormente (SOUZA et al., 2018). O fitol é um diterpeno que possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2013b).

A amirina é um triterpeno, que possui importantes propriedades biológicas e propriedades farmacológicas (JAIR et al., 2018; MOURA et al., 2019) como gastroprotetor (OLIVEIRA et al., 2004), ansiolítico, antidepressivo (ARAGÃO et al., 2007) e antinoceptivo (PINTO et al., 2008), bem como atividades antioxidante e citotoxicidade (FABIYI et al., 2012; SUNIL et al., 2014), caracterizando esses extratos como biologicamente ativos.

Em geral, pode-se confirmar que as técnicas de extração e condições de operação aplicadas influenciaram substancialmente a composição dos extratos. Por exemplo, os compostos de interesse estão presentes em maior concentração nos extratos obtidos quando scCO₂ foi utilizado como solvente (Experimentos 6-9). No entanto, embora os extratos de PLE tenham exibido menores concentrações dos compostos de interesse nos resultados globais, em termos de rendimento de extração, atividades antioxidantes e fenólicos totais, os resultados foram bastante satisfatórios. Conseqüentemente, pode-se concluir que o PLE é uma abordagem viável para a obtenção de extratos de folha de bardana (*A. lappa*) com altas atividades biológicas.

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *A. lappa* OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO EMPREGADOS.

Composto	RT	Area relativa (%) [*]								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Trietil fosfato	15,23	5,99	6,10	3,91	1,38	n.d.	n.d.	0,61	1,7	0,66
2,4-Di-tert-Butil Fenol	32,27	5,96	7,25	6,49	n.d.	5,93	n.d.	0,39	0,84	n.d.
Heptadecano	39,58	8,72	3,37	6,96	n.d.	6,84	8,91	0,55	1,30	0,54
Acetato de Fitol	44,09	n.d.	n.d.	n.d.	1,32	n.d.	7,69	2,13	4,26	1,76
Fitol	46,75	10,45	10,45	10,64	0,98	4,76	n.d.	0,88	1,61	0,72
Docosane	52,75	2,55	4,72	3,84	n.d.	3,38	n.d.	n.d.	n.d.	0,55
Ciclohexasiloxane	62,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,15	1,46	1,43	1,36
Fitato diisotil	64,58	5,13	2,88	6,32	0,48	n.d.	6,42	19,89	38,60	0,97
Tetracontane	72,77	2,56	3,40	n.d.	2,28	3,51	6,06	0,43	n.d.	2,56
Hexatricontane	77,05	2,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,73	1,34	n.d.	9,33
γ-sisterol	81,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,14	2,22	1,46
Acetato de Lupeol	85,03	11,49	13,76	13,58	1,65	n.d.	n.d.	0,97	n.d.	n.d.
α-aminina	85,88	4,19	n.d.	n.d.	6,18	3,81	2,44	7,87	4,49	9,83
Acetato de Amirina	87,5	5,64	n.d.	n.d.	12,57	6,94	5,71	18,23	6,32	13,80
Lupeol	91,10	13,09	4,82	6,66	20,28	17,65	8,59	34,52	19,52	36,24

RT, tempo de retenção; n.d., não detectado, Extratos: (1) PLE, 15 MPa / 40°C; (2) PLE, 25 MPa / 40°C; (3) PLE, 15 MPa / 80°C; (4) PLE, 25 MPa / 80°C; (5) PLE, 20 MPa / 60°C; (6) scCO₂-SE, etapa 1; (7) scCO₂-SE, etapa 2; (8) scCO₂-SE, etapa 3; (9) scCO₂ + EtOH_{H2O}.

*Área do pico em relação à área do pico do padrão.
n.d.: não detectado.

FONTE: A autora (2019)

4.4 CONCLUSÃO

O presente trabalho investigou o potencial de diferentes métodos para extrair compostos biologicamente ativos de folhas de *A. lappa*. PLE e SFE com scCO₂ são alternativas ambientalmente corretas às técnicas convencionais, tendo se mostrado eficazes e viáveis para obtenção de extratos de folhas de *A. lappa* com boas propriedades biológicas, viabilizando seu uso em outras aplicações. Embora todos os extratos obtidos pelos diferentes métodos examinados tenham exibido propriedades biológicas ativas, o PLE apresentou foi a técnica que apresentou maior rendimento de extração (37,40%), enquanto os procedimentos de extração supercrítica sequenciais (SE) com scCO₂+EtOH e, em única etapa com scCO₂ + EtOH_{H2O} alcançaram rendimento de 12,78% e 9,12%, respectivamente. Além disso, o PLE apresentou vantagem sobre as outras técnicas porque, além do maior rendimento, mostrou bons resultados para a recuperação de compostos bioativos de folhas de *Arctium lappa*, confirmado pelas altas concentrações de compostos fenólicos, como o ácido clorogênico e rutina hidratada, além da alta atividade antioxidante mensurada. O PLE com presença de água como solvente (solução hidroalcoólica) mostrou-se uma opção promissora em termos de aumento do rendimento global, concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

A temperatura demonstrou uma influência positiva no processo e os melhores resultados gerais foram obtidos na temperatura mais alta aplicada, 80°C e 15 Mpa. Isso se deve ao fato de que o aumento da temperatura melhora a difusão e a solubilidade dos compostos fenólicos no solvente e, portanto, promove a sua recuperação.

Correlações positivas entre TPC e atividade antioxidante também foram observadas para os extratos PLE. Em resumo, as vantagens identificadas para o PLE comprovam sua aplicação para a extração de compostos de interesse a partir de matrizes vegetais como *A. lappa*.

Neste trabalho, pela primeira vez, as capacidades das técnicas de alta pressão para obter compostos bioativos com alta atividade antioxidante de folhas de bardana são apresentados. Além disso, os resultados obtidos podem servir como um incentivo para o cultivo e exploração desta matéria-prima facilmente disponível e de baixo custo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou a investigação de diferentes métodos de extração, frente a recuperação de compostos das folhas de *Arctium lappa*. Os resultados encontrados indicam uma boa recuperação, referente aos bons rendimentos de extratos obtidos por diferentes métodos de extração: extração supercrítica (SFE - scCO₂) e extração com líquido pressurizado (PLE).

Para as extrações supercríticas utilizando CO₂ supercrítico como solvente, evidenciou-se uma significativa melhora de rendimentos, quando se adicionou no sistema o solvente orgânico etanol, atuante como co-solvente da SFE. Este fato é explicado pela capacidade do etanol em aumentar a polaridade da mistura de solventes, favorecendo a remoção dos solutos polares das folhas da *A. lappa*, alterando as propriedades do solvente como difusividade, densidade e viscosidade. As condições de extração avaliadas, indicaram que a variável temperatura tem influência significativa para o processo. O aumento da temperatura possibilitou a obtenção de maiores quantidades de extrato, com propriedades biológicas ainda ativas. Desta forma, a condição considerada ótima para extração desta matriz vegetal foi 15 MPa e 80°C, com rendimento de aproximadamente 6%. O extrato obtido nestas condições apresentou bons resultados referentes a atividades biológicas como antioxidante e antimicrobiana. Além disto, foram identificados compostos de elevado interesse biológico como a amirina, que apresenta propriedades citotóxica, antioxidante e atividade antibacteriana, entre outras.

Os extratos supercríticos foram avaliados quando a sua atividade imunomoduladora. Frente aos resultados obtivos, os extratos apresentaram-se como potenciais atuantes de regulação do sistema complemento, pela análise das vias clássica e alternativa. Os bons resultados encontrados levantaram a hipótese de esta matriz vegetal poder ser utilizada como alternativa promissora no tratamento de doenças inflamatórias associadas à ativação do complemento.

Para as extrações com líquido pressurizado, verificou-se que a utilização de uma solução hidroalcoólica, com fração mássica de água em etanol fixa em 12%, como solvente, promoveu uma boa resposta frente aos resultados de rendimento. A melhora em presença de água, concorda com o relato anterior, onde indica-se que a presença de um solvente de elevada polaridade promove uma maior recuperação dos compostos presentes na matriz vegetal, indicando assim que possivelmente a maioria

dos compostos de sua constituição apresentam característica polar. A partir de uma avaliação das variáveis do processo, para o PLE, a temperatura também apresentou-se como fator predominante e, desta forma, os melhores resultados foram obtidos para os extratos recuperados sob 15 MPa e 80°C, com rendimento de aproximadamente 37%. Este extrato apresentou propriedades biológicas satisfatórias. A boa atividade antioxidante encontrada tende a estar relacionada aos altos níveis de compostos fenólicos identificados, principalmente rutina e ácido clorogênico. Em relação a sua composição química, compostos de interesse também puderam ser identificados como fitol, lupeol e amirina.

Em suma, os extratos obtidos de folhas de *A. lappa* apresentam significativo potencial biológico, para todos os métodos de extração avaliados. Pela comparação entre os métodos, a PLE apresenta-se como uma alternativa promissora de obtenção destes extratos, uma vez que possibilita maiores rendimentos de extração.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros relacionados a este tema, recomenda-se:

- Realizar um estudo econômico a cerca da viabilidade financeira dos métodos de extração aqui testados.
- Buscar a otimização dos processos para que permitam a máxima recuperação individual, ou seja, o isolamento dos compostos de interesse com elevado potencial biológico, como a amirina.
- Avaliar a recuperação de pigmentos presentes nestes extratos, visando sua aplicação em produtos alimentícios.
- Avaliar o potencial extrativo de outros solventes orgânicos, passíveis de serem aplicados como co-solventes.
- Realizar testes *in vivo* da atividade antioxidante dos extratos.
- Realizar testes *in vitro* e *in vivo* de atividade anti-tumoral dos extratos.
- Avaliar a atividade imunomoduladora pela via das lectinas para regulação da ativação do sistema complemento.
- Promover o micro-encapsulamento dos extratos, a fim de verificar sua estabilidade biológica neste cenário.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N. et al. Antibacterial β -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 32–37, 2015.
- ABOUTABL, E. A.; EL-TANTAWY, M. E.; SHAMS, M. M. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile constituents from the roots , leaves , and seeds of *Arctium lappa* L . (Asteraceae) grown in Egypt. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 12, p. 173–176, 2013.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary – secondary metabolism interface Asaph Aharoni and Gad Galili. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239–244, 2011.
- ALBAN, S. et al. Differentiation Between the Complement Modulating Effects of an Arabinogalactan-Protein from *Echinacea purpurea* and Heparin. **Planta Medica**, v. 68, p. 1118–1124, 2002.
- ALMEIDA, A. B. A. DE et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) in TNBS colitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 300–310, 2013.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.
- AOAC. **Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, TX, 1999.
- AOCS. **(American Oil Chemists Society), Official Methods and Recommended Practices**. AOCS, Champaign, IL, 1994.
- ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl .) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 2006, p. 827–834, 2007.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 3. ed. [s.l.] Viçosa: UFV, 2004.

ASEP, E. K. et al. Effects of polar cosolvents on cocoa butter extraction using supercritical carbon dioxide. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 152–160, 2013.

BABOVA, O. et al. Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 358–363, 2016.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARBI, R. C. T. et al. Eriobotrya japonica seed as a new source of starch: Assessment of phenolic compounds, antioxidant activity, thermal, rheological and morphological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 646–658, 2018.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARROS, F. W. A. et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. **Chromatographia**, v. 72, n. 9, 2010.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493–496, 1996.

BAUMGARDT, F. J. L. et al. Lipid content and fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* before and after extraction with conventional solvents and/or compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 89–95, 2016.

BELGHIT, S. et al. Activity of 2, 4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 160–169, 2016.

BELTRAME, M. H. et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in pediatrics**, v. 2, n. January, p. 1–14, 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 76,

p. 70–76, 1996.

BHALE, S. D. et al. Oregano and rosemary extracts inhibit oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhaden oil. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 504–508, 2007.

BHATTACHARYYA, S.; SEKAR, V.; MAJUMDER, B. CDKN2A-p53 mediated antitumor effect of Lupeol in head and neck cancer. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 2, p. 145–155, 2017.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature International Journal of Science**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BOON, H.; SMITH, M. **55 Most Common Medicinal Herbs: The Complete Natural Medicine Guide**. 2. ed. [s.l.] Robert Rose, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **Decreto no. 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 1961.

BRAVO, L. Polyphenols : Chemistry , dietary sources , metabolism , and nutritional significance. **Nutrition Review**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. 1. ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.

BURLANDO, B. et al. **Herbal Principles in Cosmetics. Properties and Mechanisms of Action**. [s.l.] Taylor and Francis Group, LLC, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese

medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157–2184, 2004.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126, p. 1182–1193, 2001.

CARDOZO, E. L. et al. Selective Liquid CO₂ Extraction of Purine Alkaloids in Different *Ilex paraguariensis* Progenies Grown under Environmental Influences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6835–6841, 2007.

CARLOTTO, J. et al. Identification of a dicaffeoylquinic acid isomer from *Arctium lappa* with a potent anti-ulcer activity. **Talanta**, v. 135, p. 50–57, 2015.

CARLOTTO, J. et al. Polysaccharides from *Arctium lappa* L.: Chemical structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 954–960, 2016.

CARRILHO, E. et al. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 509–515, 2001.

CARVALHO JUNIOR, R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CHAN, Y. S. et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 245–254, 2011.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. **Food Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 479–484, 2004.

CLAUDIU, R. et al. Mitodepressive , antioxidant , antifungal and anti-inflammatory effects of wild-growing Romanian native *Arctium lappa* L . (Asteraceae) and *Veronica persica* Poiret (Plantaginaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, n. November 2017, p. 44–52, 2018.

COCKERILL, F. R. et al. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard - Eleventh Edition.** [s.l.: s.n.]. v. 32

CORREA, M. et al. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 128–135, 2016.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. [s.l.] Ministério da Agricultura: Instituto de Desenvolvimento Florestal, 1984.

CRUZ, P. N. et al. Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO₂ + ethanol solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, n. November 2018, p. 55–64, 2019.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 1 Edição ed. Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, 2003.

CZAIKOSKI, K. et al. Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 79–85, 2015a.

CZAIKOSKI, K. et al. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145–153, 2015b.

D'ORAZIO, N. et al. Marine Bioactives : Pharmacological Properties and Potential Applications against Inflammatory Diseases. **Marine Drugs**, v. 10, p. 812–833, 2012.

DA PORTO, C.; NATOLINO, A. Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, p. 239–245, 2017.

DALMOLIN, I. et al. Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, n. 6, p. 797–801, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. [s.l.] Artmed, 2010.

DANLAMI, J. M. et al. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605–626, 2014.

DAS, A. et al. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017.

DE AZEVEDO, A. B. A. et al. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 543–552, 2008.

DEAN, J. R.; KHUNDKER, S. Extraction of pharmaceuticals using pressurised carbon dioxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 7, p. 875–886, 1997.

DUFFUS, L. J. et al. A comparative study on the capacity of a range of food-grade particles to form stable O/W and W/O Pickering emulsions. **JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE**, v. 473, p. 9–21, 2016.

DUH, P.-D. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linné): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 455–461, 1998.

EDGAR, T. F.; HIMMELBLAU, D. M. **Optimization of Chemical Processes**. Singapore: McGraw-Hill International Editions, 1989.

EL-DARIER, S. M.; SALAMA, S. G. *Arctium Lappa* L. (Asteraceae); a New Invasive Highly Specific Medicinal Plant Growing in Egypt. **Pyrex Journal of Plant and Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 44–53, 2016.

EL-KOTT, A. F.; BIN-MEFERIJ, M. M. Use of *Arctium lappa* Extract Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 77, p. 73–78, 2015.

ELLER, S. C. W. DE S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 131–136, 2015.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015.

ESPINOSA-PARDO, F. A. et al. Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 101, p. 1–10, 2017.

EVANS-OSSES, I.; MESSIAS-REASON, I. DE; RAMIREZ, M. I. The Emerging Role of Complement Lectin Pathway in Trypanosomatids: Molecular Bases in Activation , Genetic Deficiencies , Susceptibility to Infection , and Complement System-Based Therapeutics. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FABIYI, O. A. et al. Antioxidant and Cytotoxicity of β -Amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* Leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., p. S981–S984, 2012.

FERRACANE, R. et al. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 399–404, 2010.

FERREIRA, F. A.; CRUZ, R. S.; FIGUEIREDO, A. M. S. Superbactérias. O problema mundial da resistência a antibióticos. **Ciência Hoje**, v. 48, p. 23–27, 2011.

FERREIRA, S. R. S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 235–245, 1999.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 0260, p. 263–269, 2002.

FERRENTINO, G. et al. Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. **Journal of Cleaner Production**, v. 186, p. 253–261, 2018.

FETZER, D. L. et al. Extraction of baru (*Dipteryx alata vogel*) seed oil using compressed solvents technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. January, p. 23–33, 2018.

FILIP, S. et al. Isolation and characterization of *Maclura* (*Maclura pomifera*) extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 995–1000, 2015.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales. El discórides renovado**. [s.l.] Editorial Labor, 1988.

FRANK, M. M. Complement: A brief review. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 84, n. 4, p. 411–420, 1988.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological Activities of Lupeol. **International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 46–66, 2009.

GAO, Q.; YANG, M.; ZUO, Z. Overview of the anti-inflammatory effects , pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L. **Nature Publishing Group**, v. 39, n. 5, p. 787–801, 2018.

GARCIA-MENDOZA, P. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart .) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9–16, 2017.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 1089–1098, 2004.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and separations process principles**. 4. ed. [s.l.] New Jersey: Prentice Hall, 2003.

GENTIL, M. et al. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 3, p. 184–186, 2006.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. 1 Edição d ed. São Paulo: Edição do Autor, 1983.

GONÇALVES, R. et al. Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum . & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 204–211, 2016.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982–989, 2009.

GUEDES, A. R. et al. Extraction of citronella grass solutes with supercritical CO₂ , compressed propane and ethanol as cosolvent : Kinetics modeling and total phenolic assessment. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. January, p. 16–22, 2018.

GUO, Q. et al. Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 82–88, 2016.

HAGHI, G.; HATAMI, A.; MEHRAN, M. UPLC and HPLC of caffeoyl esters in wild and cultivated *Arctium lappa* L. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 321–326, 2013.

HALLIWELL, B. antioxidant; free radical; lipid peroxidation; oxidative damage; hydroxyl radical; v. 49, n. 10, p. 2952, 1995.

HARBOE, M.; MOLLNES, T. E. The alternative complement pathway revisited. **Journal Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1074–1084, 2008.

HINNEBURG, I.; DAMIEN DORMAN, H. J.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 122–129, 2006.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

HOLLENDER, J. et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. **Journal of Chromatography A**, v. 776, n. 2, p. 233–243, 1997.

HU, M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nuficera*). **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 327–333, 2002.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, T. C. et al. Effect of *Arctium lappa* L. in the dextran sulfate sodium colitis mouse model. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 33, p. 4193–4199, 2010.

HULTQVIST, M. et al. A neu arthritis therapy with Oxidative Burst Inducers. **Plos Medicine**, v. 3, n. 9, 2006.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821–1835, 2011.

ISHIGURO, Y. et al. Variation of total FOS, total IOS, inulin and their related-metabolizing enzymes in burdock roots (*Arctium lappa* L.) stored under different temperatures. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, n. 3, p. 232–238, 2010.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: Ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da associação médica brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41–51, 2001.

JAIR, E. et al. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to obtain

α / β - amyrin-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess .). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. October 2017, p. 1–8, 2018.

JAISWAL, R.; KUHNERT, N. Identification and characterization of two new derivatives of chlorogenic acids in arnica (*Arnica montana* L.) flowers by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4033–4039, 2011.

JEELANI, S.; KHUROO, M. A. Triterpenoids from *Arctium lappa*. **Natural Product Research**, v. 26, p. 654–658, 2012.

JESSOP, P. G.; SUBRAMANIAM, B. Gas-Expanded Liquids. p. 2666–2694, 2007.

JIAJUN, D. et al. Autotoxicity of Phthalate Esters in Tobacco Root Exudates : **Pedosphere: An International Journal**, v. 27, n. 6, p. 1073–1082, 2017.

JIANG, J. et al. Inhibition of lipid oxidation and rancidity in precooked pork patties by radical-scavenging licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, 2013.

JIANG, X. W. et al. Caffeoylquinic acid derivatives from the roots of *Arctium lappa* L. (burdock) and their structure-activity relationships (SARs) of free radical scavenging activities. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 159–163, 2016.

JIANG, Y. et al. Extraction and antioxidant activities of polysaccharides from roots of *Arctium lappa* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 531–538, 2019.

JIN, W. et al. Isolation of Constituents and Anti-complement Activity from *Acer okamotoanum*. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 2, p. 172–176, 2007.

KARDOŠOVÁ, A. et al. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *Herkules*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 1–3, p. 135–140, 2003.

KATALINIC, V. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, p. 550–557, 2006.

KAVOURA, D. et al. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia fruticosa*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, n. July 2018, p. 159–164, 2019.

KIM, W. et al. Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 211–216, 2009.

KIM, Y. et al. Inhibitory Effect and Mechanism of *Arctium lappa* Extract on NLRP3 Inflammasome Activation. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

KNEZ et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 2014.

KNIPPING, K. et al. In Vitro and In Vivo Anti-Allergic Effects of *Arctium lappa* L. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 11, p. 1469–1477, 2008.

KONG, Y. et al. Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajaninstilbene acid and pinostrobin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Food Chemistry**, v. 117, n. 1, p. 152–159, 2009.

KOPCAK, U.; MOHAMED, R. S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2 SPEC. ISS., p. 209–214, 2005.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

KU, M.-K.; LIU, H.-C.; LIN, S.-R. Efficacy analysis of preserved great burdock essence compounds. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 5, n. 1–2, p. 67–70, 2013.

KULANGARA, K. et al. 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 44–50, 2015.

LANZA, M. et al. Phase behavior of castor oil in compressed propane and n-butane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2 SPEC. ISS., p. 215–221, 2005.

LEPOJEVIĆ, I. et al. Solid-liquid and high-pressure (liquid and supercritical carbon dioxide) extraction of *Echinacea purpurea* L. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 159–168, 2017.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1003–1008, 2007.

LIMA, A. R. et al. Avaliação n vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531–536, 2006.

LIN, C.-C. et al. Anti-inflammatory and Radical Scavenge Effects of Arctium lappa. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 24, p. 127–137, 1996.

LIN, S. C. et al. Hepatoprotective effects of Arctium lappa Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. **Journal of biomedical science**, v. 9, n. 5, p. 401–409, 2002.

LIU, H. et al. Determination of the major constituents in fruit of Arctium lappa L. by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with HPLC separation and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 28, p. 2707–2711, 2010.

LIU, W. et al. In vitro and in vivo antioxidant activity of a fructan from the roots of Arctium lappa L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 446–453, 2014.

LIU, Y.; WANG, M. W. Botanical drugs: Challenges and opportunities. Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, n. 9–10, p. 445–449, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. [s.l.] Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LOU, C. et al. Arctigenin , a lignan from Arctium lappa L ., inhibits metastasis of human breast cancer cells through the downregulation of MMP-2 / -9 and heparanase in MDA-MB-231 cells. **Oncology Reports**, v. 37, p. 179–184, 2017.

LOU, Z. et al. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2441–2446, 2010a.

LOU, Z. et al. Assessment of antibacterial activity of fractions from burdock leaf against food-related bacteria. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1272–1278, 2010b.

LOU, Z. et al. Ionic liquids based simultaneous ultrasonic and microwave assisted extraction of phenolic compounds from burdock leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 716, p. 28–33, 2012.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

MABONA, U. et al. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 45–55, 2013.

MACHADO, F. B. et al. Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctium lappa* by a bioassay-guided fractionation. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1852–1859, 2012.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1207–1220, 1984.

MANUEL, F. et al. Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 9–21, 2018.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006, 2011.

MARTINEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. [s.l.] UNICAMP, 2005.

MARTÍNEZ, R. et al. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 39–45, 2012.

MATHERN, D. R.; HEEGER, P. S. Molecules Great and Small: The Complement System. **Renal Immunology**, v. 10, p. 1636–1650, 2015.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. **Extração por fluido supercrítico** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1996.

MCNEIL, M. J. et al. Fitoterapia Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Cleome rutidosperma* DC. **Fitoterapia**, v. 129, n. July, p. 191–197, 2018.

MELLO, B. T. F. DE et al. Methyl acetate as solvent in pressurized liquid extraction of crambe seed oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, n. September 2018, p. 66–73, 2019.

MELO, M. M. R. DE; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of vegetable matrices : Applications , trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115–176, 2014.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127–130, 2001.

MESOMO, M. C. et al. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 102–109, 2012.

MESOMO, M. C. **Obtenção de extrato de gengibre (*zingiber officinale roscoe*) usando CO₂ supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica.** [s.l.] UFPR, 2013.

MESOMO, M. C. et al. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44–49, 2013.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316–320, 2005.

MIGLANI, A.; MANCHANDA, R. K. Observational study of *Arctium lappa* in the treatment of acne vulgaris. **Homeopathy**, v. 103, n. 3, p. 203–207, 2014.

MILANI, G. B. et al. Cariniana domestica fruit peels present topical anti-inflammatory efficacy in a mouse model of skin inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, p. 513–528, 2019.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH Å assay : A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.

MOREIRA, P. L.; VILLAS BOAS, P. J. F.; FERREIRA, A. L. A. Association between oxidative stress and nutritional status in the elderly. **Revista da associação médica brasileira**, v. 60, n. 1, p. 75–83, 2014.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.

MOUAHID, A. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from *Jatropha curcas*: An experimental and modelling study. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 141, n. September 2017, p. 2–11, 2018.

MOURA, K. et al. α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, n. June 2018, p. 1860–1866, 2019.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.

NAIR, S. A. et al. Promising anti-diabetes mellitus activity in rats of β -amyirin palmitate isolated from *Hemidesmus indicus* roots. **European Journal of Pharmacology**, v. 734, n. 1, p. 77–82, 2014.

NASCIMENTO, A. D. P. et al. The Journal of Supercritical Fluids Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 1–7, 2016.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. v. 20, p. 157–160, 2009.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, 2003.

OKOYE, N. N. et al. beta-Amyrin and alpha-amyirin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity beta-Amyrin and alpha-amyirin acetate isolated from the stem bark of. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 11, p. 1478–1486, 2014.

OLIVEIRA, F. A. et al. Gastroprotective Effect of the Mixture of α - and β -Amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **Planta Medica**, v. 70, p. 780–782, 2004.

OLIVEIRA, J. R. et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). **Journal of Oral Biology**, v. 9, p. 3–9, 2014.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; MEIRELES, M. A. A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction : Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. **Food and Public Health**, v. 3, n. 6, p. 289–303, 2013.

OTERO-PAREJA, M. J. et al. Green Extraction of Antioxidants from Different Varieties of Red Grape Pomace. **Molecules**, p. 9686–9702, 2015.

OTERO, P.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. I.; GARCÍA-RISCO, M. R. Application of pressurized liquid extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 86–92, 2019.

OUÉDRAOGO, J. C. W. et al. Enhanced extraction of flavonoids from *Odontonema strictum* leaves with antioxidant activity using supercritical carbon dioxide fluid combined with ethanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 131, n. July 2017, p. 66–71, 2018.

PAES, J. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8–16, 2014.

PARK, S. Y. et al. Lignans from *Arctium lappa* and Their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. v. 55, n. 1, p. 150–152, 2007.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds : Fundamentals , Applications and Economic Perspectives. p. 340–372, 2010.

PEREIRA, D. T. V. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. **Journal of Food Engineering**, v. 240, n. July 2018, p. 105–113, 2019.

PEREIRA, J. V. et al. Antimicrobial Activity of *Arctium lappa* Constituents Against Microorganisms Commonly Found in Endodontic Infections. v. 16, p. 192–196, 2005.

PÉREZ-GONZÁLEZ, M. Z. et al. Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Activities of the *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) Leaf Extract in Chronic Models. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

PEZESHK, S.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Effects of Turmeric , Shallot Extracts , and Their Combination on Quality Characteristics of Vacuum-Packaged Rainbow Trout Stored. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 387–391, 2011.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants : an evolutionary perspective. v. 5, n. 10, p. 439–445, 2000.

PIMENTEL-MORAL, S.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J. Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from Hibiscus sabdariffa. **The Journal of Supercritical Fluids**, n. November, p. 0–1, 2018.

PINTO, S. A. H. et al. Antinociceptive effect of triterpenoid a , b -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, v. 15, p. 630–634, 2008.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PORTO, C. DA; DECORTI, D.; NATOLINO, A. The Journal of Supercritical Fluids Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc : A comparison and a proposal. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 87, p. 1–8, 2014.

PORTO, C. DA; NATOLINO, A.; DECORTI, D. The Journal of Supercritical Fluids Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol – water mixture as. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 87, n. September 2012, p. 59–64, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific Application to the Determination of Vitamin E 1. v. 341, p. 337–341, 1999.

PRIOR, R. L.; CAO, G. IN VIVO TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY : COMPARISON OF DIFFERENT ANALYTICAL METHODS. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 99, p. 1173–1181, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, Z.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 215–226, 2009.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396–3402, 2000.

PYO, D.; KIM, E. Rapid and Efficient Extraction of Curcumins from Curry Powder Using. **Bull Korean Chem. Soc.**, v. 35, n. 10, p. 3107–3110, 2014.

QUEIROZ, A.; CAJAIBA, J. A sustainable process for (-)- α -bisabolol extraction from *Eremanthus erythropappus* using supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 39–46, 2016.

RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 3–29, 2002.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. v. 20, n. 12, p. 522–531, 2002.

RAUTH, S. et al. Lupeol evokes anticancer effects in oral squamous cell carcinoma by inhibiting oncogenic EGFR pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 417, n. 1, p. 97–110, 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS Radical Cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REVERCHON, E.; MARCO, I. DE. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166, 2006.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010.

RODRIGUES, V. M. et al. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: A pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n. 1, p. 21–36, 2002.

RODRIGUEZ, J. M. F. et al. Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO₂ and co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 135, n. December 2017, p. 25–33, 2018.

ROSSI JR, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology and**

Viticulture., v. 16, p. 144–158, 1965.

RUCKENSTEIN, E.; SHULGIN, I. Entrainer effect in supercritical mixtures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 180, n. 1–2, p. 345–359, 2001.

RYDBERG, J. **Introduction to solvent extraction. Chap 1.** New York: Marcel Dekker, 1992.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: A lesson from a pediatric institution in a developing country. **The pediatric infectious disease Journal**, v. 19, p. 200–2006, 2000.

SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 240–253, 2009.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products : A review on methods of extraction , chromatographic separation , and detection. **FRIN**, v. 82, p. 59–70, 2016.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109–115, 2009.

SÁNCHEZ-BURGOS, J. A. et al. Isolation of lupeol from white oak leaves and its anti-inflammatory activity. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 827–832, 2015.

SANCHEZ-CAMARGO, A. P. et al. Supercritical Fluid Extraction. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Madrid: Reedijk, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. **Journal Science Food Agriculture**, v. 270, p. 270–276, 1998.

SANDLER, S. I. **Chemical, Biochemical and Engineering Thermodynamics**. 4. ed. [s.l.] Wiley, 2006.

SANGEETHA, J.; VIJAYALAKSHMI, K. Determination of Bioactive Components of Ethyl Acetate Fraction of Punica granatum Rind Extract. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 3, n. 2, p. 116–122, 2011.

SANTOS, A. C. et al. Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L . p. 795–801, 2008.

SANTOS, Ê. R. M. et al. The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L . roots : Yield , composition , kinetics , bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 1–9, 2017.

SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, n. Suppl 1, 2008.

SCHWALBE, R.; STEELE-MORRE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. [s.l: s.n.].

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods , beverages and spices : Antioxidant activity and health effects –. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHARIF, K. M. et al. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich extract from *Pereskia bleo*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 1314–1322, 2015.

SHEN, Y. et al. Characterization of neuronal cell death induced by complement activation. **Brain Research Protocols**, v. 1, p. 186–194, 1997.

SHIBAMOTO, T.; MOON, J.-K. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

SILVA, C. F. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of macadamia (*macadamia integrifolia*) nut oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 01, p. 175–181, 2008.

SILVA, D. C. M. N. et al. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 7, n. January, p. 317–326, 2009.

SILVA, L. M. DA et al. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L . accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 179–187, 2013a.

SILVA, R. O. et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455–464, 2013b.

SIMÁNDI, B. et al. Supercritical fluid extraction of dandelion leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, n. 2, p. 135–142, 2002.

SIMÕES, C. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Universidade UFRGS e UFSC, 1999.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. **Introdução a Termodinâmica para Engenharia Química**. 7. ed. São Paulo: McGraw-Hill International Editions, 2005.

SOHN, E. et al. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. **Clinical and Molecular Allergy**, p. 1–11, 2011.

SOLANA, M. et al. Extraction of bioactive enriched fractions from *Eruca sativa* leaves by supercritical CO₂ technology using different co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 245–251, 2014.

SOLDI, C. et al. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008.

SOLTANI, S.; MAZLOUMI, S. H. A new empirical model to correlate solute solubility in supercritical carbon dioxide in presence of co-solvent. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 125, p. 79–87, 2017.

SOLYOMVÁRU, A. et al. A simple and effective enrichment process of the antiproliferative lignan arctigenin based on the endogenous enzymatic hydrolysis of *Serratula tinctoria* and *Arctium lappa* fruits. v. 50, p. 2281–2288, 2015.

SOTO-ARMENTA, L. C. et al. Extraction yield and kinetic study of *Lippia graveolens* with supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, n. December

2018, p. 205–210, 2019.

SOUSA, E. M. B. D. et al. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 229–241, 2002.

SOUZA, A. R. C. DE et al. Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂ + ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, n. April, p. 137–146, 2018.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 1, p. 35–52, 2005.

STALIKAS, C. D. Review Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, p. 3268–3295, 2007.

SU, S.; CHENG, X.; WINK, M. Phytochemistry Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 301–307, 2015.

SU, S.; WINK, M. Phytochemistry Natural lignans from *Arctium lappa* as antiaging agents in *Caenorhabditis elegans*. **Phytochemistry**, v. 117, p. 340–350, 2015.

SULAIMAN, G. M. et al. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2415–2421, 2011.

SUNIL, C. et al. Antioxidant and free radical scavenging effects of β -amyrin isolated from *S. cochinchinensis* Moore. leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 510–516, 2014.

SURVESWARAN, S. et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, p. 938–953, 2007.

TATIYA, A. U. et al. Journal of Traditional and Complementary Medicine Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Bridelia retusa* (Spreng) bark. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 441–451, 2017.

TEIXEIRA, A. et al. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. p. 15638–15678, 2014.

TIAN, X. et al. Neuroprotective effects of *Arctium lappa* L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 189–198, 2014.

TRABELSI, D. et al. Supercritical extraction from *Citrus aurantium amara* peels using CO₂ with ethanol as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 117, p. 33–39, 2016.

TYAGI, T.; AGARWAL, M. Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. **Journal of Pharmacology and Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 195–206, 2016.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 3, p. 395–411, 1992.

VALADEZ-CARMONA, L. et al. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 131, p. 99–105, 2018.

VAVILIN, D.; VERMAAS, W. Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. v. 1767, p. 920–929, 2007.

VEGGI, P. C. et al. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 89, p. 68–77, 2014.

VIGANÓ, J. et al. Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 1–10, 2016.

VISZWAPRIYA, D. et al. In vitro and in vivo antibiofilm potential of 2, 4-Di-tert-butylphenol from seaweed surface associated bacterium *Bacillus subtilis* against group A streptococcus. **Microbiological Research**, v. 191, p. 19–31, 2016.

WAGNER, E.; FRANK, M. M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nature reviews drug discovery**, v. 9, p. 43–56, 2010.

WALLIS, R. et al. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. **Immunobiology**, v. 215, n. 1, p. 1–11, 2010.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and Identification of Meal Antioxidative Component in Canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1285–1290, 1994.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WANG, P. et al. Arctigenin inhibits prostate tumor cell growth in vitro and in vivo. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 13, p. 1–11, 2017.

WANG, B. SEN et al. Protective effects of burdock (*Arctium lappa* Linne) on oxidation of low-density lipoprotein and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 729–738, 2006.

WANG, W. et al. ScienceDirect Lupeol acetate ameliorates collagen-induced arthritis and osteoclastogenesis of mice through improvement of microenvironment. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 79, n. 155, p. 231–240, 2016.

WENNERSTEN, R. **Extraction of organic compounds. Chap 9**;. New York: Marcel Dekker, 1992.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940–949, 2007.

WU, X. et al. Arctigenin but not arctiin acts as the major effective constituent of *Arctium lappa* L. fruit for attenuating colonic inflammatory response induced by dextran sulfate sodium in mice. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 505–515, 2014.

XU, Z. et al. The Antidiabetic Activity of Total Lignan from Fructus Arctii against Alloxan-induced Diabetes in Mice and Rats. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. April 2008, p. 97–101, 2008.

YANG, Y. C.; WEI, M. C. Ethanol solution-modified supercritical carbon dioxide extraction of triterpenic acids from *Hedyotis corymbosa* with ultrasound assistance and determination of their solubilities. **Separation and Purification Technology**, v. 150, p. 204–214, 2015.

YAYLI, N. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 14, p. 1741–1745, 2005.

ZHAO, F.; WANG, L.; LIU, K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 122, n. 3, p. 457–462, 2009.

ZHAO, J. et al. Antitubercular activity of *Arctium lappa* and *Tussilago farfara* extracts and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 796–800, 2014.

ZHAO, S.; ZHANG, D. Supercritical fluid extraction and characterisation of *Moringa oleifera* leaves oil. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 497–502, 2013.

ZUKNIK, M. H. et al. Solubility of virgin coconut oil in supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 240–244, 2016.

ZULKAFI, Z. D. et al. Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 123–129, 2014.